



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0023

DER BAKTERIELLE METABOLISMUS
DES HERBIZIDS 2,4-D:
STRUKTUR UND EXPRESSION DES GENS TFDA
AUS ALCALIGENES EUTROPHUS JMP134

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Wolfgang Streber
aus
München

Januar 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. H. Zenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Organismen und Plasmide	8
2. Nährmedien und Lösungen	11
2.1. Minimalmedien	11
2.2. 2,4-D-Testmedium	12
2.3. Vollmedien	12
2.4. Lösungen	13
3. Enzyme und Chemikalien	14
4. Geräte	15
5. Mikrobiologische Techniken	16
5.1. Kulturbedingungen	16
5.2. Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte	16
5.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen	17
5.4. Transposonmutagenese	17
5.4.1. Konjugative Übertragung des Tn5-Trägerplasmids	17
5.4.2. Test auf 2,4-D-Abbau	18
5.5. Gammadelta-Mutagenese	18
5.5.1. Transformation des Gammadelta-Stammes	18
5.5.2. Konjugativer Transfer von F-Gammadelta-Kointegraten	18
5.6. Konjugative Übertragung von broad-host-range-Plasmiden	19
5.6.1. Transfer aus <u>Alcaligenes eutrophus</u> in <u>E. coli</u>	19
5.6.2. Transfer aus <u>E. coli</u> in <u>Alcaligenes</u> und <u>Pseudomonas</u>	20
6. Isolierung von Plasmid-DNA	21
6.1. Analytische Isolierung von rekombinanten Plasmiden	21
6.2. Präparative Isolierung von Plasmiden aus <u>E. coli</u>	22
6.2.1. Anzucht und Ernte der Zellen	22
6.2.2. Zellysis und Vorreinigung der DNA	22
6.2.3. Reinigung über CsCl-Dichtegradienten	23

6.3. Präparative Isolierung großer Plasmide aus <u>A. eutrophus</u> ...	24
6.3.1. Anzucht und Ernte der Zellen	24
6.3.2. Zellysis und Vorreinigung der DNA	25
6.3.3. Reinigung über CsCl-Dichtegradienten	26
7. Techniken der DNA-Manipulation <u>in vitro</u>	27
7.1. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	27
7.2. Phenolextraktion und Ethanol-fällung	27
7.2.1. Phenolextraktion	27
7.2.2. Ethanol-fällung	28
7.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA	28
7.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	29
7.4.1. Minigele	29
7.4.2. Große Gele	29
7.5. Bestimmung von DNA-Konzentrationen	30
7.6. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten	30
7.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
7.7.1. Extraktion aus niedrigschmelzender Agarose	31
7.7.2. Elektrophoretischer Transfer auf DEAE-Membran	31
7.8. Ligation von DNA	32
7.8.1. Ligation kohesiver DNA-Enden	32
7.8.2. Klenow-Füllung und Ligation überstehender DNA-Enden	33
7.9. Transformation von <u>E. coli</u> mit Plasmid- oder Phagen-DNA ...	33
7.9.1. Herstellung und Aufbewahrung kompetenter Zellen	33
7.9.2. Transformationsvorgang	34
8. Techniken der Proteinbiochemie	35
8.1. Spezifische Markierung plasmidkodierter Proteine	35
8.2. Überexpression plasmidkodierter Proteine	36
8.3. Zellaufschluß und Rohextraktgewinnung	36
8.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	37
8.5. Proteinanreicherung über Ionenaustauschchromatographie	37
8.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	38
8.7. Elektrophoretische Übertragung von Proteinen auf Glasfaser ..	38
8.8. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	39

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten <u>in vivo</u>	40
9.1. Substratabhängige Sauerstoffaufnahme bei <u>A. eutrophus</u>	40
9.2. Seitenkettenspaltung von 2,4-D in <u>Escherichia coli</u>	40
10. DNA-Sequenzierung	42
10.1. Unidirektionale Deletion mittels ExonukleaseIII	42
10.2. Isolierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA	43
10.3. Sequenzreaktion nach der Didesoxynukleotidmethode	44
10.3.1. Herstellung der Stammlösungen	44
10.3.2. Primerannealing und Polymerasereaktion	44
10.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von Oligonukleotiden....	45
10.4.1. Vorbehandlung der Elektrophoreseplatten	45
10.4.2. Herstellung der Gele	46
10.4.3. Elektrophoresebedingungen	46
10.4.4. Fixieren, Trocknen und Autoradiographie der Gele .	47
10.5. Computeranalyse der Sequenzdaten	47
III. ERGEBNISSE	48
1. Erzeugung von transposoninduzierten Mutationen im Gen <u>tfdA</u>	48
1.1. Transposonmutagenese mit Tn5	48
1.2. Identifizierung von Plasmidmutanten durch <u>in vivo</u> -Transfer	49
1.3. Bestimmung der spezifischen Gendefekte	50
1.3.1. Wachstumstests auf 3-Chlorbenzoat	50
1.3.2. Enzymtests auf Umsetzung von 2,4-D und 2,4-DCP	51
1.4. Charakterisierung der Mutanten durch Restriktionsanalyse .	54
2. Klonierung von Genen des 2,4-D-Abbaus in <u>E. coli</u>	56
2.1. Konstruktion von rekombinanten Plasmiden	56
2.2. Identifizierung von Tfd-Genen durch Transferexperimente ..	59
2.2.1. Gene des Chlorocatechol-Abbaus	59
2.2.2. Gen <u>tfdA</u> des 2,4-D-Abbaus	59
2.3. Physikalische Charakterisierung der rekombinanten Plasmide	61
3. Klonierung des Gens <u>tfdA</u> auf einem 3 kb SacI-Fragment von pJP4	63
3.1. Konstruktion von rekombinanten Plasmiden mit SacI	63
3.2. Identifizierung des Gens <u>tfdA</u> durch Komplementation	64

3.3. Expression der <u>tfdA</u> -Genfunktion in <u>A. eutrophus</u> JMP222 ...	64
3.3.1. Untersuchung von Enzymaktivitäten für die Umsetzung von Phenol und Phenoxyessigsäure	66
3.3.2. Etablierung eines Phenoxyessigsäure metaboli- sierenden Weges in <u>A. eutrophus</u> JMP222	67
3.4. Umklonierung des <u>tfdA</u> -Fragments in den Vektor pKT231	68
3.5. Charakterisierung der rekombinanten Plasmide	71
4. Expression der <u>tfdA</u> -Genfunktion in <u>Pseudomonas</u> B13	72
5. Charakterisierung von <u>tfdA</u> durch Deletion, Subklonieren und Insertion von DNA-Fragmenten	74
5.1. Konstruktion der Plasmide mit breitem Wirtsbereich	74
5.1.1. Einführung von Deletionen	74
5.1.2. Subklonieren kleinerer Fragmente	76
5.1.3. Insertion fremder DNA-Fragmente	78
5.2. Einfluß von Deletionen und Insertionen auf die Expression des Gens <u>tfdA</u>	79
6. Identifizierung des Genproduktes und der Transkriptionsrichtung von <u>tfdA</u>	83
6.1. Konstruktion von Plasmiden mit induzierbarer Expression ..	85
6.2. Spezifische Markierung des von <u>tfdA</u> kodierten Proteins ...	87
7. Nachweis der <u>tfdA</u> -Genfunktion durch einen <u>in vivo</u> -Enzymtest ...	89
8. Insertions-Mutagenese des Gens <u>tfdA</u>	93
8.1. Mutagenese durch <u>in vivo</u> -Insertion von Gammadelta.....	93
8.1.1. Erzeugung von Gammadelta-Plasmidmutanten	93
8.1.2. Charakterisierung der Gammadelta-Plasmide	94
8.1.3. Test auf Genexpression bei Gammadelta-Mutanten	96
8.2. Mutagenese durch <u>in vitro</u> -Insertion des Omega-Fragments ..	96
8.2.1. Erzeugung von Omega-Plasmidmutanten	98
8.2.2. Identifizierung eines verkürzten Genprodukts	98
8.2.3. Untersuchung der Genexpression bei Omega-Mutanten .	100
9. Bestimmung der DNA-Sequenz des Gens <u>tfdA</u>	101
9.1. Konstruktion der M13-Klone für die Sequenzierung	101
9.2. Sequenzierung der M13-Klone	105
9.3. Auswertung der Sequenzdaten	108

10. Anreicherung und Charakterisierung des <u>tfdA</u> -Genprodukts	110
10.1. Reinigung des überexprimierten Proteins aus <u>E. coli</u>	110
10.2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	113
11. Analyse der DNA- und Proteinsequenz	116
11.1. DNA-Sequenz	116
11.1.1. Allgemeine DNA-Eigenschaften	116
11.1.2. Suche nach spezifischen Sequenzen	117
11.1.3. Homologie zu bekannten DNA-Sequenzen	117
11.2. Analyse der funktionellen Sequenzen von <u>tfdA</u>	117
11.2.1. Kodonverwendung	121
11.2.2. Ribosomale Bindungsstellen und Translationsstart	121
11.3. Aus der Aminosäurefolge abgeleitete Protein-Eigenschaften	124
11.3.1. Hydrophobizität	124
11.3.2. Sekundärstruktur	124
11.3.3. Homologie zu bekannten Proteinsequenzen	127
IV. DISKUSSION	128
1. Strategie der <u>tfdA</u> -Klonierung	129
2. Aufklärung der Struktur von <u>tfdA</u>	134
3. Struktur und Expression des Gens <u>tfdA</u>	135
3.1. Translation	135
3.2. Transkription und mögliche Promotorstrukturen	136
4. Eigenschaften der von <u>tfdA</u> kodierten 2,4-D-monooxygenase	139
5. Vergleich von <u>tfdA</u> mit verwandten katabolischen Genen	141
5.1. Andere 2,4-D-abbauende Organismen	141
5.2. Abbau von anderen aromatischen Kohlenwasserstoffen	142
5.3. Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen	144
6. Mögliche Anwendung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse	144
6.1. Gentechnischer Transfer in Mikroorganismen	144
6.2. Gentechnischer Transfer in höhere Pflanzen	146
V. ZUSAMMENFASSUNG	149
VI. LITERATURVERZEICHNIS	152

ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
°C	Grad Celsius
3-CB	3-Chlorbenzoesäure
ccc	kovalent geschlossen zirkulär
Ci	Curie
4-CP	4-Chlorphenol
4-CPA	4-Chlorphenoxyessigsäure
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DCP	2,4-Dichlorphenol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Meter
M	molar (mol/l)
MCPA	2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure
min	Minute
mol	Grammolekulargewicht
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
μ	Mikro
n	Nano
n.b.	nicht bestimmt
PAA	Phenoxyessigsäure
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

I. EINLEITUNG

2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) war das erste moderne Herbizid, das in die Landwirtschaft eingeführt wurde. Die herbizide Eigenschaft dieser Verbindung wurde im Zusammenhang mit den ersten Untersuchungen über die Wirkung der Pflanzenhormone entdeckt. 1928 wies der Botaniker Went auf die Bedeutung der sogenannten Auxine für das Wachstum von Pflanzen hin, dem Chemiker Kögl gelang 1934 die Isolierung und Strukturaufklärung der β -Indolylessigsäure als dem physiologischen Auxin. In der Folgezeit untersuchten mehrere Arbeitsgruppen die Wuchsstoffwirkung arylsubstituierter Essigsäuren. Dabei stellten sie fest, daß auxinartig wirkende Substanzen, wie z.B. Naphthylelessigsäure, eine selektive Wirkung auf verschiedene Pflanzenarten ausüben, und daß höhere Konzentrationen das Pflanzenwachstum hemmen und die Pflanzen sogar abtöten können. Im Jahre 1942 entdeckten dann P. W. Zimmermann und H. E. Hitchcock vom Boyce Thompson Institute (USA) die starke Wuchsstoff- und Herbizidwirkung des 2,4-D.

Über die Wirkung des 2,4-D auf molekularer Ebene ist bis heute noch wenig bekannt. Man weiß, daß 2,4-D in niederen Konzentrationen die Auxinwirkung der β -Indolylessigsäure imitiert. Diese Eigenschaft macht sich die Zellkulturtechnik zunutze, um undifferenziertes Kallusgewebe und Zellsuspensionen mit Hilfe synthetischer Medien zu kultivieren. Die herbizide Wirkung von höheren 2,4-D-Konzentrationen beruht vermutlich auf einer Hemmung der DNA-Synthese und der Zellatmung (Nakamura et al. 1986).

Bereits 1944 wurde 2,4-D in der Landwirtschaft als Herbizid zum Schutz von Getreidefeldern gegen breitblättrige Unkräuter eingesetzt. Die Jahresproduktion betrug damals in den USA über 10000 Tonnen. Der Erfolg dieses Herbizids

führte zu einer intensiven Forschung auf dem Gebiet der Herbizidchemie, die eine Fülle neuer Substanzen hervorbrachte und noch heute hervorbringt. Obwohl diese Substanzen das 2,4-D in der Anwendung immer mehr verdrängten, konnte es sich bis heute in gewissen Anwendungsbereichen behaupten, so daß zu Beginn der 80er Jahre die Jahresproduktion in den USA immerhin noch knappe 6000 Tonnen betrug (Sinton et al. 1986).

Die langdauernde und weitverbreitete Anwendung von 2,4-D als Herbizid führte zur Entwicklung und Verbreitung von Bakterien, welche in Erdboden und Gewässern 2,4-D abzubauen vermögen. Im Laufe einer evolutionsgeschichtlich kurzen Zeitspanne haben sie Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, diese in der Natur sonst nicht vorkommende (xenobiotische) Verbindung zur Energiegewinnung und als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Sie gehören damit zu einer Gruppe von Mikroorganismen, vorwiegend Gram-negativen Bakterien, die sich auf den Abbau von halogenierten aromatischen Verbindungen spezialisiert haben, und die damit einen wesentlichen Anteil an der Beseitigung dieser in Landwirtschaft und Industrie häufig genutzten xenobiotischen Substanzen haben (Ghosal et al. 1985a). Zahlreiche Bakterien verschiedener Genera sind bereits aufgrund ihrer 2,4-D-abbauenden Eigenschaften isoliert und näher charakterisiert worden (Tabelle 1).

Die Mikrobiologie befaßt sich schon seit geraumer Zeit mit der Aufklärung der Abbauewege für das 2,4-D und ihrer genetischen Grundlagen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse liefern nicht nur wichtige Informationen über das metabolische Schicksal dieser Substanz in der Umwelt als einem Modellsystem für xenobiotische Substanzen (Sinton et al. 1986), sondern sie eröffnen auch die Nutzung der an diesen Abbauewegen beteiligten Gene mit Hilfe moderner gentechnischer Methoden. Dabei sind verschiedene Anwendungsgebiete

Tabelle 1 2,4-D abbauende Bakterien.

Bakterien	Literatur
<u>Achromobacter</u>	Bell (1957)
<u>Alcaligenes</u>	Fisher <u>et al.</u> (1978) Don und Pemberton (1981)
<u>Arthrobacter</u>	Tiedje <u>et al.</u> (1969)
<u>Corynebacterium</u>	Rogoff und Reid (1956)
<u>Pseudomonas</u>	Evans <u>et al.</u> (1971) Tyler und Finn (1974)

denkbar, wie die biotechnologische Umwandlung von Stoffen in der Industrie, die Schaffung von Organismen mit neuen Abbauleistungen für die Abwasserreinigung und die Erzeugung herbizidresistenter Nutzpflanzen für die Landwirtschaft und die Züchtungsforschung (Pemberton 1983).

Einer der biochemisch und genetisch am besten untersuchten Stämme aus der Gruppe der 2,4-D abbauenden Bakterien ist Alcaligenes eutrophus JMP134, der erstmals von Pemberton et al. (1979) aus Ackerboden isoliert und charakterisiert wurde. Er enthält das ca. 80 kb große, konjugative Plasmid pJP4, das der Inkompatibilitätsgruppe IncP1 angehört. Durch Transfer- und "Curing"- Experimente konnte nachgewiesen werden, daß das Plasmid pJP4 die genetische Information für den Metabolismus von drei Herbizidverbindungen enthält. So verlieh das Plasmid nach seiner konjugativen Übertragung auf Alcaligenes eutrophus, Alcaligenes paradoxus und Pseudomonas putida die Fähigkeit, 2,4-D, 2-Methyl-4-chlorphen-oxyessigsäure (MCPA) oder 3-Chlorbenzoesäure (3-CB) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Don und Pemberton 1981, Friedrich et al. 1983). Kürzlich wurde das

Plasmid pJP4 mittels Restriktionsanalyse und Transposon-mutagenese näher charakterisiert (Don und Pemberton, 1985). Fünf der am Abbau von 2,4-D und 3-CB beteiligten Gene, bezeichnet als tfd-Gene, wurden durch Markierung mit den Transposons Tn5 und Tn1771 auf dem Plasmid pJP4 lokalisiert (Abbildung 1) und durch biochemische Untersuchungen näher charakterisiert (Don et al. 1985). Dabei konnte den aufgefundenen Genen ihre genaue Funktion im Abbau von 2,4-D zugeordnet werden (Tabelle 2).

Die Ergebnisse bestätigten einen von Evans et al. (1971) für den Abbau von 2,4-D vorgeschlagenen Weg, der vom 2,4-D über das 2,4-Dichlorphenol zum 3,5-Dichlorcatechol verläuft und von dort in den für 2,4-D und 3-CB gemeinsamen Weg der ortho-Spaltung von Chloraromaten mündet (Abbildung 2).

Während die Lage und Funktion der Gene für die Schritte B bis F im 2,4-D-Abbau durch die Arbeiten von Don et al. (1985) weitgehend aufgeklärt waren, blieben Lage und Struktur eines postulierten Gens tfdA weiterhin unbekannt. tfdA sollte ein Enzym kodieren, das im Allgemeinen als 2,4-D-monooxygenase bezeichnet wird und die Abspaltung der Acetatseitenkette vom 2,4-D bewirkt, wobei 2,4-Dichlorphenol und eine C₂-Verbindung - vermutlich Glyoxylat - gebildet werden. Keine der von Don et al. (1985) beschriebenen Transposonmutanten wiesen einen Defekt in diesem Schritt auf, so daß eine Lokalisation von tfdA durch Transposoninsertion nicht möglich war.

Auch Klonierungsexperimente lieferten keine Hinweise auf das Gen tfdA; so wurde ein 14.5 kb EcoRI-Fragment von pJP4, auf dem die in Tabelle 2 aufgeführten Gene lokalisiert worden waren, in E. coli kloniert und mit Hilfe eines mobilisierbaren Vektorplasmids mit breitem Wirtsbereich in einen von pJP4 kurierten Alcaligenes eutrophus Stamm übertragen. Der mit dem rekombinanten Plasmid ausgestattete Stamm konnte gut auf 3-CB wachsen, eine Verwertung von

Tabelle 2 Von Don et al. (1985) auf pJP4 lokalisierte Gene des 2,4-D-Abbaus und die zugehörigen Enzyme.

Gen:	Enzym:
<u>tfdB</u>	2,4-Dichlorphenolhydroxylase
<u>tfdC</u>	Chlorcatechol-1,2-dioxygenase
<u>tfdD</u>	Chlormuconat-cycloisomerase
<u>tfdE</u>	4-Carboxymethylen-2-en-4-olid(dienlacton)hydrolase
<u>tfdF</u>	<u>trans</u> -Chlordienlacton-isomerase

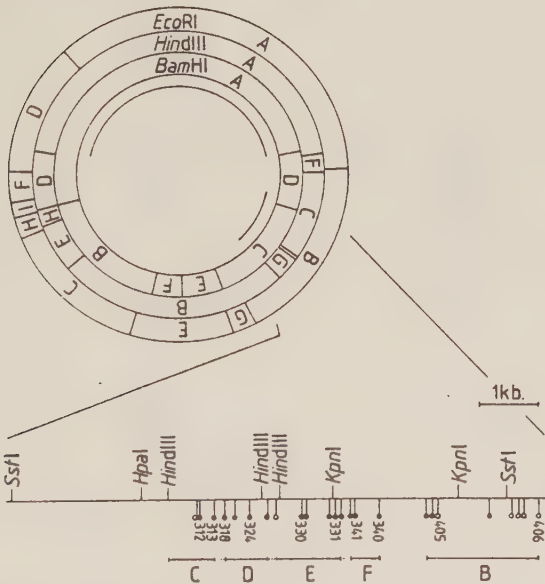


Abbildung 1 Restriktionskarte und partielle Genkarte von pJP4 (Don et al. 1985). Die Karte zeigt die Insertionsstellen von Tn5 und Tn1771, die den 2,4-D-Abbau inaktivierten. Aufgrund ihres Phänotyps wurden die Mutanten in fünf Klassen eingeteilt (Klassen B bis F).

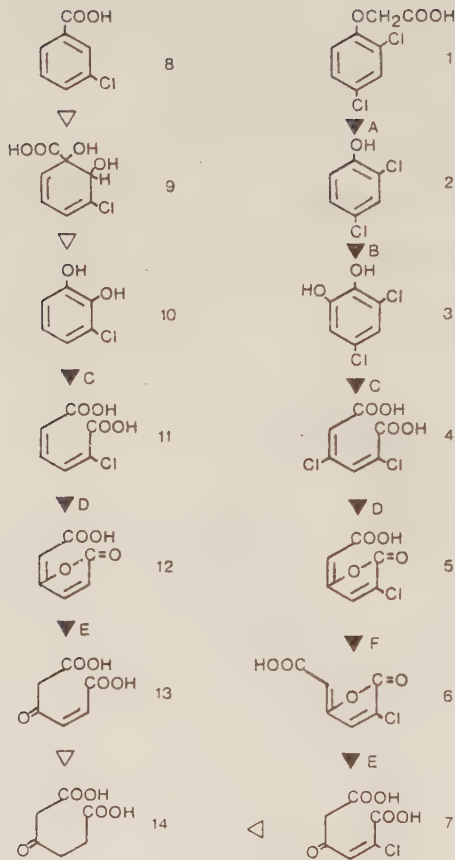


Abbildung 2 Abbauewege für 2,4-D und 3-CB in *A. eutrophus* JMP134. Leere Dreiecke bezeichnen chromosomal kodierte Schritte, gefüllte Dreiecke bezeichnen plasmidkodierte Schritte. Folgende Metabolite treten dabei auf: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1), 2,4-Dichlorphenol (2), 3,5-Dichlorcatechol (3), 2,4-Dichlormuconsäure (4), trans-2-Chlordienlacton (5), cis-2-Chlordienlacton (6), Chlormaleyllessigsäure (7), 3-Chlorbenzoesäure (8), 3-Chlordihydrodihydroxybenzoesäure (9), 3-Chlorcatechol (10), 2-Chlormuconsäure (11), Dienlacton (12), Maleyllessigsäure (13), 3-Ketoadipinsäure (14).

2,4-D wurde zwar zunächst vermutet, (Don et al. 1985) konnte jedoch in weiteren Versuchen nicht bestätigt werden (Don, persönl. Mitteilung). tfdA war möglicherweise nicht wie das für die Phenolhydroxylierung verantwortliche Gen tfdB in enger Nachbarschaft zum sogenannten Gencluster des Chlorocatecholweges (Schritte C bis F) lokalisiert, oder ein zur Expression von tfdA nötiges Regulationsgen war auf dem klonierten Fragment nicht vorhanden. Einen ersten Hinweis auf die ungefähre Lage von tfdA gab eine Veröffentlichung von Amy et al. (1985), in der die Klonierung eines 21 kb großen HindIII-Fragments von pJP4 beschrieben wurde. Das klonierte Fragment exprimierte in E. coli die Fähigkeit, aus einer radioaktiv markierten Acetatseitenkette von 2,4-D radioaktives CO₂ freizusetzen.

Es war das Ziel dieser Arbeit, das Gen tfdA zu klonieren und seine Struktur so weit als möglich aufzuklären. Diese Untersuchungen sollten unser Wissen über die genetische Organisation des bakteriellen Abbaus von 2,4-D weiter vervollständigen und mit Hilfe der dabei gewonnenen Erkenntnisse eine spätere Nutzung des Gens im Hinblick auf die bereits angedeuteten biotechnologischen Anwendungen möglich machen. Dabei stand der Gedanke an eine gentechnische Veränderung von Pflanzen im Vordergrund. Eine mit dem Gen tfdA und den nötigen Expressionssignalen ausgestattete Pflanze könnte in der Lage sein, den potenten Wachsthemmstoff 2,4-D zu unwirksamen Metaboliten abzubauen, was möglicherweise eine Resistenz der Pflanze gegen 2,4-D zur Folge hätte. Diese Eigenschaft könnte sich für die direkte Anwendung in der Landwirtschaft eignen, sie könnte ferner in der Pflanzenmolekularbiologie und -zellfusionstechnik zur positiven Selektion genetisch transformierter bzw. hybrider Pflanzenzellen dienen und damit für die moderne Züchtungsforschung von Nutzen sein.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen und Plasmide

Die für sämtliche Versuche verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 aufgeführt. Tabelle 4 enthält Plasmide, Phagen und DNA-Fragmente, die als Ausgangsprodukte für die Herstellung der in den Ergebnissen beschriebenen rekombinanten Plasmide und Phagen dienten.

Tabelle 3 Bakterienstämme.

A. <u>Alcaligenes eutrophus</u> Stämme		
Stamm	Phänotyp/Genotyp	Herkunft/Referenz
JMP134	Tfd ⁺ (pJP4)	R. H. Don (1981)
JMP222	<u>str</u> 201, Tfd ⁻ , pJP4-freies Derivat von JMP134	R. H. Don (1981)
JMP134Paa	Mutante von JMP134, wächst auf 2,4-D und PAA	D. Pieper, Wuppertal
JMP134:Tn5-2	Transposonmutante von JMP134 (Tn5 integriert in pJP4, Tra ⁺ , IncP1, <u>tfdA</u> ⁻)	diese Arbeit
JMP134:Tn5-4	Transposonmutante von JMP134 (Tn5 integriert in pJP4, Tra ⁺ , IncP1, <u>tfdA</u> ⁻)	diese Arbeit

Tabelle 3 (Fortsetzung)

B. <u>Escherichia coli</u> K12-Stämme		
Stamm	Phänotyp/Genotyp	Herkunft/Referenz
HB101	F ⁻ , <u>hsdS</u> 20, <u>recA</u> 13, <u>ara</u> -14, <u>proA</u> 2, <u>lacY</u> 1, <u>galK</u> 2, <u>rpsL</u> 20, <u>xyl</u> -5, <u>mtl</u> -1, <u>supE</u> 44, λ ⁻	H. W. Boyer (1969)
HMS174	<u>recA</u> 1, <u>hsdR</u>	
JA222	<u>trpE</u> 5, <u>recA</u> , <u>hsdR</u> ⁻ , <u>leuB</u> 6, <u>lacY</u> 1, λ ⁻	L. Clarke (1978)
JM101	Δ <u>lacpro</u> , <u>thi</u> , <u>supE</u> , F' <u>traD</u> 36, <u>proAB</u> , <u>lacI</u> ^q ΔM15	J. Messing (1981)
K38 = C600	F ⁻ , <u>lacY</u> 1, <u>leuB</u> 6, <u>supE</u> 44, <u>thi</u> -1, <u>thr</u> -1, <u>tonA</u> 21, λ ⁻	R. K. Appleyard (1954)
LC707	F-Plasmid	J. L. Ramos, Genf
LE392	F ⁻ , <u>hsdR</u> 514, <u>supE</u> 44, <u>supF</u> 58, <u>lacY</u> 1, <u>galK</u> 2, <u>galT</u> 22, <u>metB</u> 1, <u>trpR</u> 55, λ ⁻	N. E. Murray (1977)
S17-1	<u>thi</u> , <u>hsdR</u> ⁻ , <u>hsdM</u> ⁺ , <u>recA</u> , <u>pro</u> , chromosomal integriertes RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 (Tp, Sm)	R. Simon (1983b)

Tabelle 4 Plasmide, Phagen und DNA-Fragmente

Bezeichnung	Phänotyp/Genotyp	Herkunft/Referenz
pDOC37	Ap, EcoRI-Fragment mit <u>traT</u> -Gen hinter λ -P _L , Omega-Fragment	D. O'Connor, Genf
pGP1-2	P _{lac} /cI857(λ -Repressor), P _L /T7-Gen1 (RNA-Polymerase), Km, P15Aori	S. Tabor (1985)
pGSS33	Tra ⁻ , Mob ⁺ , RSF1010ori, Cm, Tc, Sm, Ap, IncQ,	G. S. Sharpe (1984)
pJP4	IncP1, Tra ⁺ , Hg, Tfd ⁺	R. H. Don (1981)
pKT231	Tra ⁻ , Mob ⁺ , RSF1010ori, Sm, Km, IncQ	M. Bagdasarian (1982)
pRME1	Ap, Tc, Km, ColE1ori (pBR322 mit einem 1.2 kb HaeII-Segment von Tn903, flankiert von Vielfachrestriktionsstellen)	W. Messer, erhalten von K. N. Timmis, Genf
pSUP202	pBR325-Mob, Ap, Cm, Tc	R. Simon (1983a)
pSUP2021	Mob-Sequenz und Transposon Tn5 in pBR325, Ap, Cm, Tc (pBR325-Mob)::Tn5	R. Simon (1983b)
pT7-5	ColE1ori, Ap, T7-Promotor	S. Tabor, Boston
pT7-6	ColE1ori, Ap, T7-Promotor	S. Tabor, Boston
pUC19	<u>lacZ</u> , Ap	J. Norrander (1983)
pVK101	Tra ⁻ , Mob ⁺ , RK2ori, Km, Tc, IncP1	V. C. Knauf (1982)
M13tg130	<u>lacZ</u>	M. P. Kieny (1983)
M13tg131	<u>lacZ</u>	M. P. Kieny (1983)
Omega-Fragment	Sm/Sp, flankiert von T4-Transkriptionsstop-, Translationsstopsignalen u. Polylinker	P. Prentki (1984)

2. Nährmedien und Lösungen

2.1. Minimalmedien

M9-Medium 6 g/l Na_2HPO_4
 3 g/l KH_2PO_4
 0.5 g/l NaCl
 1 g/l NH_4Cl

nach dem Autoklavieren wurden pro l Medium zugesetzt:

2 ml 1 M MgSO_4
10 ml 20% Glucose
1 ml 0.1 M CaCl_2
(1 ml 1 M Thiamin-HCl, nur M9-Agarmedium)

MS-Medium 1.6 g/l K_2HPO_4 (I)
 0.4 g/l KH_2PO_4 (I)
 0.05 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (I)
 1.0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (II)
 0.01 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (II)

Die Mineralsalze wurden in zwei getrennt sterilisierten 200fach konzentrierten Stocklösungen (I und II) aufbewahrt. Zur Herstellung von Minimalmedium wurde 1 l steriles Wasser mit je 5 ml beider Stocklösungen gemischt. Organische Kohlenstoffquellen waren in den folgenden Endkonzentrationen enthalten: 2 mM 3-Chlorbenzoat (3-CB), 1 mM 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D), 1 mM 4-Chlorphenoxyacetat (4-CPA), 4 mM Phenoxyacetat (PAA), 10 mM Fructose, 15 mM Pyruvat. Die organischen Säuren wurden als sterile 0.1 M Stocklösungen der Natriumsalze (pH 7.0) aufbewahrt und nach dem Autoklavieren den Medien zugesetzt.

EM-Lösung 1.0 g/l K_2HPO_4
 0.2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 0.1 g/l NaCl
 0.02 g/l FeCl_2
 1.0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2.2. 2,4-D-Testmedium

DEMPY-Agar	300 mg/l 2,4-D
	40 mg/l Eosin
	6.5 mg/l Methylenblau
	200 mg/l Pepton
	200 mg/l Hefeextrakt
	20 g/l Agar

2.3. Vollmedien

LB-Medium	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl

Für Selektivmedien wurden nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50°C Antibiotika in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: 50 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Rifampicin, 80 µg/ml Spectinomycin, 25 µg/ml Streptomycin. Zum Test auf β -Galactosidase bei pUC-Klonierungen in E. coli JM83 wurden pro LB-Agarplatte 40 µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) zugefügt.

PYE-Medium	3 g/l Pepton
	3 g/l Hefeextrakt

PYF-Medium	Zu 1 l PYE-Medium wurden 10 ml einer sterilen 20% Fructose-lösung zugesetzt.
------------	--

TY-Medium	16 g/l Trypton
	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl

H-Agar	10 g/l Trypton
	8 g/l NaCl
	12 g/l Agar

H-Topagar 10 g/l Trypton
 8 g/l Hefeextrakt
 8 g/l Agar

Zum Test auf β -Galactosidase bei M13-Klonierungen in E. coli JM101 wurden für eine Platte 3.5 ml flüssiger (45°C) H-Topagar mit 40 μ l X-Gal (2% in Dimethylformamid) und 40 μ l 100 mM IPTG versetzt.

Falls nichts anderes angegeben ist, enthielten Festmedien 15 g/l Agar.

2.4. Lösungen

Antibiotika-Stocklösungen wurden in den folgenden Konzentrationen zur Herstellung antibiotikahaltiger Medien eingesetzt: 20 mg/ml Rifampicin in Methanol, 20 mg/ml Kanamycin, 25 mg/ml Ampicillin, 20 mg/ml Streptomycin, 10 mg/ml Tetracyclin in 50% Ethanol, 20 mg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol.

Formamid-Farblösung wurde aus 98 g Formamid (30 min entionisiert über 5 g Amberlite MB1), 2 ml 0.5 M EDTA-Lösung (pH 8.0), 0.2 g Bromphenolblau und 0.2 g Xylencyanol hergestellt.

TBE-Puffer wurde als 10-fach konzentrierte Stocklösung aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt: 108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure, 9.3 g/l $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$.

RNase-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 10 mg RNase A wurden in 2 ml 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) gelöst, 5 min in kochendem Wasser inkubiert und schließlich mit 2 ml 40% Glycerin und 1 ml 0.5 M NaCl gemischt. Diese Stocklösung (2 mg/ml RNase, 10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 16% Glycerin, pH 7.4) wurde in Portionen aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt.

3. Enzyme und Chemikalien

Handelsübliche p.A. Chemikalien wurden von der Firma E. Merck (Darmstadt), Enzyme wurden von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen. Darüber hinaus wurden spezielle Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme der folgenden Firmen verwendet:

Amersham Buchler (Braunschweig):

Desoxyadenosin-5'- α -(³⁵S)thiotriphosphat (600 Ci/mmol, SJ304), L-(³⁵S)Methionin (SJ1015, 800 Ci/mmol).

Bethesda Research Laboratories BRL (Neu Isenburg):

Agarose (ultraPURE), Cäsiumchlorid.

Boehringer (Mannheim):

Adenosintriphosphat (ATP), lambda-DNA.

Fluka:

Ethidiumbromid

Oxoid (Wesel):

Hefeextrakt, Pepton, Trypton.

Pharmacia GmbH (Freiburg):

2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate, 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphate, M13 Single-Strand Primer (17 Basen), Mung bean Nuclease (150 U/ μ l), Exonuklease III (40 U/ μ l).

Serva (Heidelberg):

Acrylamid 2xcryst., Agar-Agar, Amberlite MB1, Ammoniumper-sulfat p.A., Antibiotika, Coomassie Blue G (SERVA Blau G), Dithiothreitol (DTT), Dodecylsulfat-Na (SDS), Harnstoff, N,N'-Methylenbisacrylamid 2xcryst. (Bis), N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED).

Sigma (München):

Agarose TypVII (low gelling temperature), L-Aminosäuren, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Dimethyldichlorsilan, Methacryloxypropyltrimethoxysilan, Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 2-Phenylethylamin, Phenoxyessigsäure (PAA), 3-Chlorbenzoesäure (3-CB), 4-Chlorphenoxyessigsäure (4-CPA).

4. Geräte

Zentrifugationen bis zu 2500 g wurden in einer Labofuge I von Heraeus durchgeführt. Für gekühlte Zentrifugationen bis zu 32000 g wurde eine Sorvall-Zentrifuge RC-5B von DuPont de Nemours verwendet. Für Ultrazentrifugationen stand eine Beckman-Zentrifuge Typ L8-M zur Verfügung. Zur Gefrier-trocknung geringer Flüssigkeitsmengen sowie zur Trocknung von DNA wurde eine Vakuumzentrifuge vom Typ Speed Vac (Savant) benutzt.

Sequenziergele wurden im Makrophor-System von LKB elektro-phoretisiert.

Für Zellaufschlüsse wurde ein Ultraschallgerät vom Typ Branson Sonifier B15 verwendet.

Mit Ethidiumbromid gefärbte Gele wurden mit einem 302 nm UV-Durchlichtkasten von Vilber Lourmat illuminiert und mit einer Polaroidkamera photographiert, die mit einem UV-Filter No.23A und einem Polaroid-Film Typ 552 ausgerüstet war.

Proteintrennungen wurden mit einer FPLC-Anlage von Pharmacia durchgeführt, die mit einer MonoQ-Ionenaustauscher-Säule bestückt war.

Für DNA-Sequenzanalysen mit Hilfe des MicroGenie-Programms wurde ein IBM PC-XT Computer benutzt.

5. Mikrobiologische Techniken

5.1. Kulturbedingungen

Kulturen von E. coli wurden bei 37°C oder 30°C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten 16 bis 24 h angezogen. Zur Erzielung optimaler Zellausbeuten für die Plasmidisolierung wurde LB-Flüssigmedium mit 0.2% Glucose versetzt. Stämme mit einem hitzesensitiven lambda-Repressor wie K38 pGP1-2 und dessen Abkömmlinge wurden bei 30°C angezogen und bei 42°C induziert. LB-Flüssigkulturen der Stämme JM101 und LC707 wurden stets direkt mit Erhaltungskulturen angeimpft, die zur Selektion auf das F-Plasmid auf thiaminhaltigem M9-Minimalagar angezogen worden waren.

Kulturen von Alcaligenes und Pseudomonas wurden bei 30°C auf PYE-Agarplatten oder in PYE-Flüssigmedium angezogen; zur Erzielung optimaler Zellausbeuten für die Plasmidisolierung wurde das fructosehaltige PYF-Medium verwendet. Für spezielle Anzuchten wurden MS-Minimalmedien eingesetzt. So wurde A. eutrophus JMP134 auch in 2,4-D-MS-Medium (Verdopplungszeit 5 h) und in Pyruvat-MS-Medium (Verdopplungszeit 2 h) angezogen, das zur Induktion der Abbauecke für 3-CB und 2,4-D gegebenenfalls 1 mM 3-CB enthielt. Bei Flüssigkulturen wurde stets durch eine große Oberfläche und gründliches Schütteln für eine gute Belüftung gesorgt.

5.2. Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte

Lebendzellzahlen wurden durch Ausplattieren von 0.1 ml einer geeigneten Verdünnung auf Agar-Vollmedien bestimmt. Zur parallelen Bestimmung von E. coli und A. eutrophus in Konjugationsmischungen wurden Zellverdünnungen zugleich auf LB- und Fructose-MS-Agarplatten ausplattiert. Durch Inkubation der LB-Platten bei 42°C wurden ausschließlich Kolonien von E. coli erhalten, durch Inkubation der Fructose-

MS-Platten bei 30°C wurden ausschließlich Kolonien von Alcaligenes selektiert. Als Maß für die Zelldichte wurde die Absorption einer Zellsuspension bei 420 nm oder 590 nm in einem Spektralphotometer gegen das zellfreie Medium gemessen und als optische Dichte bezeichnet.

5.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Bakterienkulturen wurden auf Agarplatten bei 8°C bis zu 2 Monate gehalten. Zur längeren Aufbewahrung bis über zwei Jahre wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 0.85 ml einer über Nacht in Vollmedium angezogenen Flüssigkultur mit 0.15 ml sterilem Glycerin gemischt und bei -20°C aufbewahrt.

5.4. Transposonmutagenese

5.4.1. Konjugative Übertragung des Tn5-Trägerplasmids

Für die Transposonmutagenese wurden der Donorstamm E. coli S17-1, der das Tn5-Trägerplasmid pSUP2021 enthielt, in LB-Medium und der Rezipient A. eutrophus JMP134 in PYE-Medium bis zur späten exponentiellen Phase (5 bis 8 h) angezogen. Dann wurden beide Kulturen im Verhältnis 1 : 1 bezüglich ihrer optischen Dichte gemischt. 1.5 ml der Mischung wurden auf einer PYE-Agarplatte verteilt und die Platte wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1.5 ml steriler 0.7% NaCl-Lösung von der Platte gespült und die Bakteriensuspension wurde in zwei Schritten mit 0.7%iger NaCl-Lösung jeweils 1 : 10 (0.1 ml + 0.9 ml) verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden Portionen von 50 µl, 100 µl, 200 µl und 400 µl auf Fructose-MS-Agarplatten ausgestrichen, die 380 µg/ml Kanamycin enthielten. Zur Kontrolle der Stämme wurden die ungemischten Ausgangskulturen parallel behandelt. Die Platten wurden 3 bis 7 Tage bei 30°C inkubiert.

5.4.2. Test auf 2,4-D-Abbau

Kanamycin-resistente Stämme (Punkt 5.4.1) wurden parallel auf 2,4-D-MS-Agarplatten, DEMPY-Agarplatten und Fructose-MS-Agarplatten ausgestrichen. Letztere enthielten zusätzlich 200 µg/ml Kanamycin. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation konnten Mutanten mit dem Phänotyp Tfd⁻ anhand ihres fehlenden Wachstums auf 2,4-D-MS-Agar und der Ausbildung farbloser Kolonien auf DEMPY-Agar identifiziert werden.

5.5. Gammadelta-Mutagenese

5.5.1. Transformation des Gammadelta-Stammes

Kompetente Zellen von E. coli LC707 (F-Gammadelta) wurden mit der DNA des rekombinanten Plasmids pTJS'X535 transformiert. Transformanten wurden auf die plasmidkodierte Ap-Resistenz selektiert. Die Stämme von E. coli LC707, welche nun neben F-Gammadelta das Plasmid pTJS'X535 enthielten, wurden in der nachfolgenden Konjugation als Donorstämme eingesetzt.

5.5.2. Konjugativer Transfer von F-Gammadelta-Kointegraten

Zur konjugativen Übertragung der Plasmide wurden der Donorstamm (LC707 pTJS'X535) in 2 ml LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin über Nacht angezogen. Als Rezipient wurde ein gegen Rifampicin resistenter E. coli (LE392rif) in 2 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angezogen. Donorzellen wurden aus 400 µl Kultur abzentrifugiert (20 sec in Eppendorf), in 400 µl LB-Medium resuspendiert und mit 400 µl Rezipientenkultur gemischt. 100 µl der Mischung wurden auf eine LB-Agarplatte getropft und 4 h bei 37°C inkubiert. Der entstandene Bakterienrasen wurde in 500 µl LB-Medium suspendiert. In vier Schritten wurden mit LB-Medium Verdünnungen im Verhältnis von jeweils 1 : 10 hergestellt und in

Portionen von je 100 µl auf LB-Agar plattiert, welcher 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Rifampicin enthielt. Zur Kontrolle einer effektiven Selektion wurden die Kulturen von Donor und Rezipient separat auf die gleiche Weise behandelt. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht erhielt man aus den unverdünnten Ansätzen ca. 500 Ap- und Rif-resistente Kolonien bzw. ca. 50 Kolonien aus der ersten Verdünnungsstufe. Während die Rezipientenstämme keinerlei spontan auftretende Resistenz gegen Ampicillin aufwiesen, mußte mit ca. 1% spontan Rif-resistenten Donorstämmen unter den selektierten 500 Transkonjuganten gerechnet werden. Die restlichen 99% stellten echte Gammadelta-Mutanten dar, d.h. sie enthielten Derivate des Plasmids pTJS'X535 mit einer Insertion des Gammadelta-Fragments.

5.6. Konjugative Übertragung von broad-host-range-Plasmiden

Plasmide mit breitem Wirtsbereich (broad-host-range) mußten zum Test auf bestimmte plasmidkodierte Eigenschaften häufig auf andere Stämme übertragen werden. Zum konjugativen Transfer wurden entweder die plasmideigenen Transferfunktionen genutzt, wie im Falle von pJP4 und dessen transposonhaltigen Derivaten (Punkt 5.6.1), oder es wurden externe Transfergene zu Hilfe genommen, wie im Falle der mobilisierbaren Plasmide pVK101, pGSS33, pKT231 und deren Rekombinanten (Punkt 5.6.2).

5.6.1. Transfer aus *Alcaligenes eutrophus* in *E. coli*

Transposonmutanten von *A. eutrophus* JMP134 wurden in 5 ml PYE-Medium mit einem Zusatz von 350 µg/ml Kanamycin 8 h bei 30°C angezogen und mit einer ebenfalls frisch gewachsenen (5 h) Kultur von *E. coli* HB101 im Verhältnis 1 : 1 bezüglich ihrer optischen Dichte gemischt. Portionen von 0.1 ml wurden auf sterile Membranfilter (0.2 µm) auf PYE-Agarplatten getropft. Die Platten wurden über Nacht bei

30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit steriler 0.7% NaCl-Lösung von den Filtern gespült, in mehreren Schritten jeweils 1 : 10 verdünnt und in Portionen von 0.1 ml aus jeder Verdünnung auf LB-Agarplatten verteilt, die zur Selektion gegen den Donor 400 µg/ml Streptomycin und zur Selektion von Transkonjuganten 50 µg/ml Kanamycin enthielten. Zur Kontrolle wurden ungemischte Ausgangskulturen in gleicher Weise behandelt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.6.2. Transfer aus *E. coli* in *Alcaligenes* und *Pseudomonas*

Zum Test rekombinanter Plasmide auf Komplementation von transposoninduzierten Mutationen wurden die Mutantenstämme in 5 ml PYF-Medium über Nacht bei 30°C angezogen. 0.2 ml Zellsuspension wurden auf vorgetrocknete 2,4-D-MS-Agarplatten ausplattiert. Nach dem Antrocknen wurden die zu testenden Einzelkolonien von transformierten *E. coli* S17-1 Stämmen mit sterilen Zahnstochern auf den Platten ausgestrichen. Konjugation und Selektion fanden gleichzeitig durch Inkubation der Platten bei 30°C für 14 Tage statt. Auf diese Weise konnten 50 Donorstämme auf einer Platte gegen einen Rezipienten getestet werden.

Für die quantifizierenden Transferversuche von rekombinanten Plasmiden in *Alcaligenes*- und *Pseudomonas*-Stämme wurde der Donorstamm (*E. coli* S17-1) in LB-Medium mit Antibiotikazusatz und der Rezipientenstamm in PYF-Medium angezogen. Die Donorzellen wurden zentrifugiert (1 min, 10000 g), in dem doppelten Volumen PYE-Medium suspendiert und dann 1 : 1 mit der Rezipientenkultur gemischt. 100 µl der Zellmischung wurden auf die Oberfläche eines auf PYE-Agar platzierten Membranfilters (Millipore HA 0.45 µm) aufgebracht. Nach Inkubation für 6 h bei 30°C wurden die Zellen mit 1 ml 0.7% NaCl vom Filter gespült, in bis zu 7 Schritten 1 : 10 verdünnt und in Portionen von 100 µl auf Selektivagar plattiert.

6. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden und Phagen vom Typ M13 aus Bakterien erfolgte nach verschiedenen auf alkalischer Lyse beruhenden Methoden. Der analytischen und präparativen Isolierung von Plasmiden mit hoher und niedriger Kopienzahl sowie von M13-Phagen aus E. coli liegt das von Birnboim und Doly (1979) entwickelte Verfahren zugrunde (Punkte 6.1 und 6.2), die Isolierung von großen Plasmiden aus A. eutrophus erfolgte nach der Methode von Hansen und Olsen (1978) (siehe Punkt 6.3).

6.1. Analytische Isolierung von rekombinanten Plasmiden

Die Isolierung von rekombinanter doppelsträngiger cccDNA aus E. coli Stämmen erfolgte nach dem von Maniatis et al. (1982, S.368) beschriebenen Schnellverfahren, das geringfügig modifiziert wurde.

Dazu wurden die Stämme in 2 ml Vollmedium mit einem geeigneten Antibiotikum über Nacht (bei Plasmiden) oder 5 h (bei M13) angezogen. 1.5 ml jeder Kultur wurden in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (5 min, 10000 g), der Zellniederschlag wurde durch Absaugen von Flüssigkeitsresten befreit und bei -20°C aufbewahrt oder sofort für die Isolierung verwendet. Die (aufgetauten) Zellen wurden bei Raumtemperatur gründlich in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) suspendiert, nach 5 min wurden 200 µl Lösung II (0.2 N NaOH, 1% SDS) zugesetzt und durch Umdrehen mit der Suspension vermischt, bis die Zellen vollständig lysiert waren (ca. 5 min). Danach wurden 150 µl eisgekühlte Lösung III (60 ml 5 M Kaliumacetat, 11.5 ml Essigsäure, 28.5 ml Wasser) zugegeben, der Ansatz wurde 10 sec kräftig gemischt und 5 min in Eis aufbewahrt. Ausgefallenes Protein und chromosomale DNA wurde durch 5 min Zentrifugation bei 4°C und 10000 g abgetrennt, der

Überstand (400 µl) wurde in einem frischen Gefäß mit 400 µl Phenol/Chloroform gemischt und 5 min bei Raumtemperatur belassen. Durch 5 min Zentrifugation bei Raumtemperatur (10000 g) wurden die Phasen getrennt. Die obere wäßrige Phase wurde in einem frischen Gefäß mit 800 µl absolutem Ethanol gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (5 min, 10000 g), mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, der 20 µg/ml RNase enthielt.

6.2. Präparative Isolierung von Plasmiden aus E. coli

Zur präparativen Isolierung von Plasmid- und Phagenvektoren sowie deren Rekombinanten wurde das Verfahren von Birnboim und Doly (1979) nach Angaben von J. L. Ramos, Genf (persönl. Mitteilung) modifiziert.

6.2.1. Anzucht und Ernte der Zellen

Die Bakterienzellen wurden über Nacht in LB-Medium angezogen, das ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum enthielt. Für Plasmide mit hoher Kopienzahl, wie pUC19 und die pT7-Plasmide, wurden pro Ansatz 200 ml Kulturvolumen verwendet, für solche mit niedrigerer Kopienzahl, wie pVK101, pGSS33, pKT231 und deren Derivate, sowie zur Isolierung von doppelsträngiger DNA von M13-Phagen wurden 800 ml Kulturvolumen verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g (10 min, 4°C, Sorvall, GSA oder GS3) geerntet und entweder sofort lysiert oder bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

6.2.2. Zellysis und Vorreinigung der DNA

Die Zellen wurde in 40 ml Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) suspendiert und durch vorsichtiges Mischen mit 80 ml Lösung II (0.2 N NaOH, 1% SDS)

lysiert. Das Lysat wurde 15 min in Eis gehalten, dann wurden 60 ml eisgekühlte Lösungen III (60 ml 5 M Kaliumacetat, 11.5 ml Essigsäure, 28.5 ml Wasser) zugegeben und der Inhalt des Zentrifugenbeckers vorsichtig 5 min lang gemischt. Der Ansatz wurde bis zur vollständigen Präzipitation (15 - 30 min) in Eis gehalten und anschließend 15 min bei 4°C und 4000 g (Sorvall, GSA) zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde durch zwei übereinandergeschichtete Teesiebe in einen Zentrifugenbecher gegossen, der 100 ml eisgekühltes Isopropanol enthielt. Die Flüssigkeiten wurden gut gemischt und 15 min in Eis aufbewahrt, anschließend wurde die ausgefällte DNA 15 min bei 4°C und 12000 g (Sorvall, GS3) abzentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen und das gut abgetropfte DNA-Pellet wurde langsam bei Raumtemperatur in 6 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen. Die Lösung wurde in kleinere Zentrifugenbecher (Sorvall, SS34) überführt und mit soviel TE-Puffer versetzt, bis die Masse der Lösung insgesamt 9.5 g betrug. 10.0 g Cäsiumchlorid wurden darin langsam aufgelöst und 0.5 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) wurden zugemischt. Die daraufhin ausgefallenen Bestandteile wurden 15 min bei 18°C und 1100 g abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein Polyallomer-Röhrchen mit 13.5 ml Fassungsvermögen (Beckman) überführt und der verbleibende Raum mit flüssigem Paraffin aufgefüllt.

6.2.3. Reinigung über CsCl-Dichtegradienten

Durch Zentrifugation des verschlossenen Röhrchens für 48 h bei 18°C, 40000 Upm in einem Titan Festwinkelrotor vom Typ 50 Ti (Beckman) wurde der Dichtegradient ausgebildet. Die Bande aus kovalent geschlossener zirkulärer (ccc-) DNA wurde durch UV-Beleuchtung (302 nm) sichtbar gemacht und mit einer Injektionsnadel aus dem Gradienten entnommen. Die

DNA-Lösung (ca. 1 ml) wurde zuerst mit 2 Volumenteilen Wasser und dann mit 6 Volumenteilen Ethanol bei Raumtemperatur gemischt. Die so ausgefällte DNA wurde 15 min bei 18°C und 12000 g (Sorvall, SS34) abzentrifugiert und in 500 µl Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 15 µl 5 M NaCl und 10 µl RNase-Lösung versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 500 µl Phenol/Chloroform gemischt, zentrifugiert (Eppendorf-System) und die abgetrennte wäßrige Phase mit 1 ml Ethanol versetzt. Nach Fällung bei -20°C für mindestens 30 min wurde die DNA 10 min bei 4°C abzentrifugiert (10000 g, Eppendorf-System), mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, rezentrifugiert, im Vakuum getrocknet und in 250 µl TE-Puffer aufgenommen. Die damit erzielten DNA-Konzentrationen lagen bei 0.5 bis 1 µg/µl im Falle von Plasmiden mit hoher Kopienzahl, und bei 50 bis 100 ng/µl im Falle von solchen mit niedriger Kopienzahl.

6.3. Präparative Isolierung großer Plasmide aus *A. eutrophus*

Das im Folgenden beschriebene Verfahren basiert auf der von Hansen und Olsen (1978) entwickelten Methode. Es eignete sich besonders zur Isolierung von großen Plasmiden wie pJP4 aus Zellen von *A. eutrophus*, in denen nur jeweils eine einzige Kopie des Plasmids (single copy) vorhanden ist, da in diesem Falle eine Isolierung nach Birnboim und Doly (1979) nicht zum Erfolg führt.

6.3.1. Anzucht und Ernte der Zellen

Zellen von *Alcaligenes eutrophus* wurden über Nacht bei 30°C in 250 ml PYF-Medium angezogen und durch Zentrifugation bei 4°C und 4000 g (Sorvall, GSA) geerntet. Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

6.3.2. Zellysis und Vorreinigung der DNA

Die aufgetauten Zellen wurden in 6 ml Saccharosepuffer (25% Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) suspendiert und in einen sterilen Zentrifugenbecher (Sorvall, SS34) überführt. Nach Zusatz von 1 ml einer 5 mg/ml Lysozymlösung wurde durch Umdrehen des verschlossenen Bechers vorsichtig gemischt und dann 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 2.5 ml einer 0.25 M EDTA-Lösung (pH 8.0) zugesetzt, der Ansatz wurde erneut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zumischen von 2.5 ml SDS-Lösung (20% SDS in TE-Puffer) wurde der Lysisansatz 10 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend einer Hitzebehandlung unterworfen. Dazu wurde der Becher mehrmals im Wechsel 15 sec lang bei 55 bis 60°C im Wasserbad inkubiert und sogleich darauf 15 sec lang durch Umdrehen vorsichtig gemischt. Der Vorgang wurde 6 bis 10 mal wiederholt, bis die Lyse vollständig erschien. Durch Zusatz von 0.75 ml einer frisch bereiteten 3 N NaOH und vorsichtiges Mischen für 3 min wurde die DNA denaturiert. Daraufhin wurde die Lösung zur Neutralisation 3 min lang vorsichtig mit 6 ml einer 2 M Tris-HCl (pH 8.0) gemischt. Nach Zusatz von 3 ml SDS-Lösung und 6 ml einer eisgekühlten 5 M NaCl wurde sofort gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz 30 min bei 4°C und 32000 g (Sorvall, SS34) abzentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde sofort in einen sterilen Zentrifugenbecher abgegossen und mit 1/3 Volumen PEG-Lösung (42% PEG 6000, 100 mM Natriumphosphat, pH 7.0) gemischt. Durch Inkubation bei 4°C für 4 bis 16 h wurde die DNA vollständig ausgefällt und anschließend 5 min bei 4°C und 6000 g (Sorvall, SS34) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml TE-Puffer aufgenommen und in genau 8 ml der so gebildeten Lösung wurden 8.8 g CsCl gelöst. Nach Zusatz von 230 µl einer 5 mg/ml Ethidiumbromidlösung wurde 5 min bei 3000 g zentrifugiert,

und falls sich dabei eine PEG-Schicht auf der Flüssigkeitsoberfläche ausbildete, wurde diese entfernt. Die klare Lösung wurde in ein 13.5 ml fassendes Polyallomer-Röhrchen (Beckman) überführt und der verbleibende Raum mit flüssigem Paraffin aufgefüllt.

6.3.3. Reinigung über CsCl-Dichtegradienten

Die Reinigung der Plasmid-DNA über CsCl sowie das Entfernen von CsCl, Ethidiumbromid und RNA erfolgte nach der bereits unter Punkt 6.2.3. beschriebenen Methode. Die aus 250 ml Kulturvolumen isolierte DNA wurde zuletzt in 120 µl TE-Puffer aufgenommen. Die so erzielten DNA Konzentrationen lagen bei 50 bis 100 ng/µl.

7. Techniken der DNA-Manipulation in vitro

7.1. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

DNA-Verdauungen mit Restriktionsendonukleasen wurde entweder in den von Maniatis et al. (1982, S.104) beschriebenen Puffern oder in dem Universalpuffer TAS durchgeführt. TAS-Puffer eignet sich für alle Restriktionsenzyme gleichermaßen und wurde deshalb vor allem für gleichzeitige Verdauungen mit mehreren Enzymen verwendet. TAS-Puffer wurde als 10fach-Konzentrat aus folgenden separat sterilisierten Lösungen zusammengesetzt: 330 µl 1 M Tris-acetat (pH 7.9), 130 µl 5 M Kaliumacetat, 100 µl 1 M Magnesiumacetat, 50 µl 0.1 M DTT, 400 µl 0.1 M Spermidin. Zur vollständigen Verdauung wurden 2 U Enzym pro µg DNA in einem Reaktionsansatz von 20 µl Volumen verwendet, wobei darauf geachtet wurde, daß der Anteil der zugesetzten unverdünnten Enzymlösung 1/10 des Ansatzvolumens nicht überstieg. Der Ansatz wurde für 2 bis 4 h bei 37°C inkubiert und die Enzymreaktion durch 15 min Erhitzen auf 68°C abgestoppt.

7.2. Phenolextraktion und Ethanol-fällung

Wenn eine Hitzebehandlung zur Inaktivierung von Enzymen als nicht ausreichend angesehen wurde, wurden eine oder mehrere Phenolextraktionen angeschlossen, der immer eine Ethanol-fällung folgte.

7.2.1. Phenolextraktion

Die Phenolextraktion erfolgte stets, falls nichts anderes angegeben ist, durch Zugabe desselben Volumens Phenol/Chloroform zu einer wäßrigen DNA-Lösung, Mischen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000 g (Eppendorf-System) wurde die obere wäßrige Lösung abgenommen.

7.2.2. Ethanolfällung

Zur Ausfällung von DNA wurde die wäßrige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) versetzt und mit 2 Volumen -20°C kaltem Ethanol p.A. gemischt. Die Mischung wurde mindestens 30 min bei -20°C oder mindestens 5 min bei -70°C inkubiert und anschließend 10 min bei 4 bis 8°C und bei 10000 g (Eppendorf-System) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, der Niederschlag wurde mit -20°C kaltem 70% Ethanol p.A. gewaschen und nach dem Abtropfen verbliebener Flüssigkeit im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet.

7.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Selbstligation von Vektor-DNA zu verhindern, wurden in manchen Fällen die Phosphatgruppen an den 5'-Enden der linearisierten Vektormoleküle enzymatisch abgespalten. Dazu wurde der hitzeinaktivierte Restriktionsansatz auf 37°C vorgewärmt, mit 3 U alkalischer Phosphatase (from calf intestine) pro µg DNA versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden zu 100 µl Reaktionsmischung 80 µl Wasser, 20 µl TNE-Puffer (0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM NaCl, pH 8.0) und 10 µl 10% SDS gegeben. Die Mischung wurde 15 min auf 68°C erhitzt und dann zweimal mit gleichen Volumenteilen Phenol/Chloroform - Mischung extrahiert. Als Alternative zur Inaktivierung mittels Hitze und SDS wurde der phosphatasebehandelte Restriktionsansatz nach einem der unten beschriebenen Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt und die Vektor-DNA aus dem Agarosegel isoliert.

7.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0.1 bis 40 kb wurden horizontale Agarosegele verwendet (Maniatis et al. 1982). Die Agarosekonzentration betrug standardmäßig 0.7%, im Einzelfall jedoch bis zu 2%. Als Laufmittel wurde TBE-Puffer eingesetzt, der 0.5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/10 bis 1/5 Volumenteilen Auftragspuffer (0.25% Bromphenolblau, 50% Glycerin) vermischt. Nach der Auftrennung wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden im UV-Durchlicht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe des Polaroidsystems photographiert (Blende 4.5, 1 bis 3 sec).

7.4.1. Minigele

Zur Kontrolle von Restriktions- und Ligationsreaktionen, sowie zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurden Agarosegele der Ausmaße 75 mm x 50 mm x 3.2 mm (Querformat) verwendet. Die Geltaschen der Größe 3 mm x 2 mm besaßen ein Fassungsvermögen von 10 µl Probelösung. Die angelegte Spannung betrug 100 V, die Trennstrecke 4 cm. Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden Minigele der obigen Dimensionen im Längsformat verwendet (Laufstrecke 6 cm) und mit Geltaschen der Größe 20 mm x 2 mm versehen.

7.4.2. Große Gele

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten eines Restriktionsverdaus erfolgte mit Hilfe von Agarosegelen der Abmessungen 18.4 cm x 18.4 cm x 0.5 cm. Es enthielt 18 Geltaschen der Größe 7 mm x 1.5 mm mit einem Fassungsvermögen von maximal 40 µl. Die Auftrennung erfolgte bei 180 V über eine Trennstrecke von 8 bis 16 cm.

7.5. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde durch Vergleich eines elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsverdaus mit einem Standard bekannter DNA-Konzentration bestimmt. Dazu wurden 50 ng und 250 ng einer mit HindIII geschnittenen und 15 min auf 68°C erhitzten lambda-DNA (Boehringer, Mannheim) auf ein Minigel aufgetragen. Von einem Restriktionsverdau der zu bestimmenden Probe wurde eine Konzentrationsreihe in einem zu erwartenden Bereich von 10 bis 200 ng auf das gleiche Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben und Detektion im UV wurden zwei Banden gleicher Lichtintensität ausgewählt, mit deren Hilfe unter Berücksichtigung der Fragmentlänge die eingesetzte Menge der zu bestimmenden DNA-Probe nach folgender Formel errechnet wurde:

$$\text{Plasmid-} \quad = \quad \frac{\text{Plasmidgröße} \times \text{Größe des } \lambda\text{-Fragments} \times \lambda\text{-Menge}}{\text{menge} \quad \quad \text{Größe des Plasmidfragments} \times 48.5 \text{ kb}}$$

7.6. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Zur Restriktionskartierung von Plasmiden wurden 2 µg DNA mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen verdaut. Jeweils die Hälfte eines Restriktionsansatzes wurde auf einem großen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde entweder mit HindIII oder mit EcoRI geschnittene lambda-DNA verwendet. Mit Hilfe einer halb-logarithmischen Auftragung der Fragmentlänge gegen die Laufstrecke wurde die Länge der unbekannten Restriktionsfragmente bestimmt.

7.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um definierte Restriktionsfragmente von Plasmiden zu klonieren, wurden diese nach elektrophoretischer Auftrennung der gesamten Restriktionsansatzes nach einem der folgenden Verfahren aus dem Agarosegel isoliert.

7.7.1. Extraktion aus niedrigschmelzender Agarose

Die Bande des betreffenden Fragments mit einem Gehalt von ca. 1 µg DNA wurde mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, mit Wasser auf 0.5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und 5 min bei 68°C geschmolzen. Die noch heiße wäßrige Lösung wurde mehrmals mit Phenol extrahiert und anschließend einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die DNA wurde mit Ethanol bei -20°C ausgefällt und der gewaschene und getrocknete Niederschlag wurde entweder in Wasser oder gleich in Ligationspuffer aufgenommen.

7.7.2. Elektrophoretischer Transfer auf DEAE-Membran

Die Übertragung von DNA auf eine DEAE-Cellulose-Membran (Schleicher & Schuell, NA-45) erfolgte im Wesentlichen nach der Vorschrift des Herstellers, die auf einem ursprünglich von Winberg und Hammar skjold (1980) entwickelten Verfahren beruht. Zur Vorbereitung der DEAE-Membran wurde diese zuerst 10 min in 10 mM EDTA (pH 7.6), dann 5 min in 0.5 M NaOH und zuletzt mehrmals in Wasser gewaschen und in Wasser bei 4°C nicht länger als 4 Wochen aufbewahrt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung eines Restriktionsverdaus wurde zunächst im Gel 1 bis 2 mm unterhalb des präparativ zu gewinnenden DNA-Fragmentes ein Einschnitt angebracht, in den ein ca. 2 cm x 0.5 cm großes Stück einer DEAE-Membran mit einer Pinzette eingesetzt wurde. Die Elektrophorese wurde fortgesetzt, bis die betreffende Bande

ganz von der Membran absorbiert war. Die Membran wurde anschließend aus dem Gel entnommen und 10 min in 10 ml NET-Puffer (150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) gewaschen. Die gebundene DNA wurde wieder gelöst, indem die Membran in einem Eppendorfgefäß mit 150 µl HNET-Puffer (1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) für 30 min auf 68°C erhitzt wurde. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und die Membran weiter 10 min in 50 µl HNET-Puffer inkubiert. Die vereinigten Elutionslösungen (200 µl) wurden mit 200 µl Wasser verdünnt und mit 800 µl -20°C kaltem Ethanol gemischt. Die bei -20°C gefällte DNA wurde abzentrifugiert, gewaschen, getrocknet und entweder in Ligationspuffer oder in Wasser aufgenommen.

7.8. Ligation von DNA

Falls nichts anderes angegeben ist, wurde der Ligationspuffer aus den folgenden getrennt sterilisierten und aufbewahrten Lösungen frisch zusammengesetzt (Silhavy et al. 1984): 90 µl Pufferstocklösung (660 mM Tris-HCl, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 10 µl 10 mM ATP, 900 µl Wasser. Ein üblicher Ligationsansatz enthielt 20 U/ml T4-DNA-Ligase.

7.8.1. Ligation kohesiver DNA-Enden

Ligationsreaktionen zur Verknüpfung linearer doppelsträngiger DNA mit komplementären kohesiven Enden wurden entweder nach einer Reinigung der zu ligierenden DNA über eine Phenolextraktion und eine Ethanolgefällung, nach einer Isolierung aus dem Agarosegel oder direkt in den verdünnten Restriktionsansätzen ausgeführt. Ethanolgefällte DNA wurde dazu in Ligationspuffer aufgenommen, hitzeinaktivierte Restriktionsansätze wurden mit Wasser und der entsprechenden Menge an 10fach konzentriertem Ligationspuffer auf das vierfache Volumen verdünnt. Nach Zusatz von 0.1 bis 2 U T4-DNA-Ligase pro µg DNA erfolgte die Ligation durch Inkubation bei 12°C für 16 h.

7.8.2. Klenow-Füllung und Ligation überstehender DNA-Enden

100 µl (100 ng) einer nukleasebehandelten DNA wurden mit 50 µl Phenol gemischt, 5 min stehengelassen, anschließend mit 50 µl Chloroform gemischt und 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 300 µl -20°C kaltem Ethanol gemischt. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die gefällte DNA abzentrifugiert, gewaschen, getrocknet und in 20 µl Klenow-Puffer (20 mM Tris-HCl, 7 mM MgCl₂, 10 U/ml DNA-Polymerase I) aufgenommen. Der Ansatz wurde zunächst auf 37°C erwärmt, nach 5 min mit 2 µl einer Lösung aller 4 Desoxynukleotidtriphosphate (0.125 mM dATP, 0.125 mM dCTP, 0.125 mM dGTP, 0.125 mM dTTP) versetzt und weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 80 µl Ligationspuffer und 2 U T4-DNA-Ligase versetzt, gemischt und 6 h bei Raumtemperatur belassen.

7.9. Transformation von E. coli mit Plasmid- oder Phagen-DNA

Zur Klonierung und Vermehrung von Plasmid- und Phagen-DNA wurden Zellen von E. coli durch Behandlung mit Calciumchlorid für die DNA-Aufnahme kompetent gemacht und unter Hitzeeinwirkung mit der DNA transformiert. Die im Folgenden beschriebene Methode stellt eine Modifikation des von Mandel und Higa (1970) entwickelten Verfahrens dar.

7.9.1. Herstellung und Aufbewahrung kompetenter Zellen

400 ml LB-Medium wurden mit 0.4 ml einer über Nacht angezogenen Kultur von E. coli angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) zwischen 0.2 und 0.3 bei 30°C oder 37°C geschüttelt (ca. 2-3 h). Die Kultur wurde mindestens 15 min in Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 4000 g und 4°C (Sorvall, GS3) zentrifugiert. Die

abzentrifugierten Zellen wurden sorgfältig in 200 ml eiskühler Lösung I (100 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) resuspendiert, abzentrifugiert, dann in 200 ml eiskühler Lösung II (100 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen in 4 ml eiskühler Lösung III (15% Glycerin, 100 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) aufgenommen, in Portionen von 0.2 ml auf Eppendorfgefäße verteilt und bei $-70^{\circ}C$ bis zu 2 Monate aufbewahrt oder gleich zur Transformation verwendet.

7.9.2. Transformationsvorgang

0.2 ml kompetenter Zellen von E. coli wurden in Eis aufgetaut und mit 100 bis 200 ng doppelsträngiger cccDNA oder 10 bis 20 ng einzelsträngiger Phagen-DNA in einem Volumen von nicht mehr als 20 μl gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in einem Wasserbad 3 min auf $42^{\circ}C$ erhitzt und 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur phänotypischen Expression plasmidkodierter Antibiotikaresistenzen wurde der Ansatz mit 2 ml LB-Medium verdünnt und 1 h bei $30^{\circ}C$ bzw. $37^{\circ}C$ geschüttelt. Davon wurden Portionen von 50 bis 200 μl auf Selektivagar plattiert. Transformanten traten nach 16 h Bebrütung in Erscheinung. Im Falle der Transformation mit Phagen-DNA entfiel die Verdünnung mit LB-Medium sowie die phänotypische Expression, stattdessen wurde der gesamte Transformationsansatz gleich nach der Hitzebehandlung mit 3.5 ml geschmolzenem ($45^{\circ}C$) H-Top-Agar gemischt und auf eine vorgewärmte ($42^{\circ}C$) H-Agarplatte ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten 16 h bei $37^{\circ}C$ inkubiert.

8. Techniken der Proteinbiochemie

8.1. Spezifische Markierung plasmidkodierter Proteine

Zur spezifischen Markierung plasmidkodierter Proteine mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems wurde ein von Tabor und Richardson (1985) entwickeltes Verfahren verwendet.

Ein E. coli K38-Stamm, der sowohl das Plasmid pGP1-2 als auch eines der pT7-Derivate enthielt, wurde in 10 ml LB-Medium mit einem Zusatz von Ampicillin und Kanamycin bei 30°C angezogen. Bei einer optischen Dichte bei 590 nm von 0.5 wurden 0.2 ml Kultur 1 min bei 10000 g (Eppendorf-System) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml M9-Medium gewaschen, wieder abzentrifugiert (15 min, 2500 g, Labofuge I) und schließlich in 1 ml M9-Medium suspendiert, das 20 µg/ml Thiamin und je 0.01% aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin und Cystein (insgesamt 18) enthielt. Die Zellsuspension wurde 60 min bei 30°C geschüttelt, dann wurde die Temperatur auf 42°C erhöht. Nach 15 min wurden 10 µl Rifampicin-Lösung (20 mg/ml in Methanol) zugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 42°C wurde der Ansatz 20 min bei 30°C geschüttelt, anschließend mit 10 µCi L-(³⁵S)Methionin (Amersham, cell labeling grade) versetzt, 5 min bei Raumtemperatur belassen und dann 5 min zentrifugiert.

Zur Auftrennung des markierten Proteins über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Punkt 6.) wurden die abzentrifugierten Zellen in 120 µl Auftragspuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% Natriumlaurylsulfat, 1% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau) suspendiert und 3 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden entweder sofort auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Als Kontrolle für die Effektivität der Markierung wurden stets zwei weitere Ansätze

parallel zu obigem Verfahren behandelt, wobei der eine unter Auslassung des Rifampicinzusatzes bei 42°C induziert wurde und der andere ohne Hitzeinduktion und ohne Rifampicinzusatz 105 min bei 30°C inkubiert und anschließend markiert wurde.

Als Probe für die Proteinanreicherung über Ionenaustauschchromatographie (Punkt 5.) wurden die abzentrifugierten Zellen zweimal in 0.5 ml M9-Medium gewaschen, rezentrifugiert, und zuletzt in 0.5 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) suspendiert.

8.2. Überexpression plasmidkodierter Proteine

Um plasmidkodierte Proteine mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase-Promotor-Systems quantitativ in den Zellen anzureichern, wurde folgende Methode verwendet (Tabor, persönl. Mitteilung). Ein E. coli K38-Stamm, der sowohl das Plasmid pGP1-2 als auch eines der pT7-Derivate enthielt, wurde in 100 ml LB-Medium mit einem Zusatz von Ampicillin und Kanamycin bei 30°C angezogen. Bei einer optischen Dichte bei 590 nm von 1.0 wurde die Temperatur auf 42°C erhöht. Nach 25 min Schütteln bei 42°C wurde Rifampicin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Kultur wurde anschließend weitere 2 h bei 37°C geschüttelt und dann durch 10 min Zentrifugation bei 4000 g geerntet.

8.3. Zellaufschluß und Rohextraktgewinnung

Die Zellen einer 100 ml Kultur wurden in 4 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) suspendiert und durch Ultraschallbehandlung mit der Mikrospritze eines Branson Sonifiers aufgeschlossen. Dazu wurde die Zellsuspension in einem Corex-Zentrifugenglas unter Kühlung mit Eiswasser 5 min lang Ultraschallimpulsen mit einer Dauer von 0.5 sec und einem freien Intervall von 0.5 sec unterworfen. Bei Stellung 4 des Intensitätswahlschalters betrug die Anzeige des Geräts

40 Skalenteile. Partikuläre Zellbestandteile wurden durch 20 min Zentrifugation bei 32000 g und 4°C (Sorvall, SS34) abgetrennt. Vor der sich anschließenden Reinigung der Proteine durch die Ionenaustauschchromatographie (Punkt 8.5) wurde der Überstand der Zentrifugation durch ein Membranfilter der Porenweite 0.45 µm (Sartorius) filtriert.

8.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteingehalte wurden nach der colorimetrischen Methode von Bradford (1976) bestimmt. Relative Protein-Konzentrationen von Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie wurden außerdem während der Elution durch Messung der Aromatenabsorption bei 280 nm mit einem Durchflußphotometer ermittelt.

8.5. Proteinanreicherung über Ionenaustauschchromatographie

Die Anreicherung von überexprimierten plasmidkodierten Proteinen erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an der MonoQ-Säule einer FPLC-Anlage von Pharmacia. Dazu wurden Zellen einer 100 ml Kultur, deren Proteinsynthese nach dem unter Punkt 2 beschriebenen Verfahren optimal induziert worden war, mit spezifisch radioaktiv markierten Zellen in Tris-Puffer (Punkt 1) gemischt und mittels Ultraschall aufgeschlossen (Punkt 3). Der so gewonnene Rohextrakt (4 ml, 10 mg Protein) wurde direkt auf die Säule gepumpt (1 ml/min), mit 20 mM Tris-HCl (pH7.4) 15 min nachgewaschen und mit einem linearen KCl-Gradienten (0 - 0.4 M in 48 min, dann 0.4 - 1 M in 36 min) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1.2 ml aufgefangen. 100 µl jeder Fraktion wurden in der Vakuumzentrifuge gefriergetrocknet, in 100 µl Auftragspuffer (Punkt 1) aufgenommen und 3 min auf 95°C erhitzt. 25 µl der noch heißen Lösung wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und wie in Punkt 6 beschrieben aufgetrennt.

8.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Denaturierende Elektrophorese von Proteinen wurde mit SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (1970) durchgeführt. Dazu wurden vertikale Flachgele mit einer Breite von 14 cm, einer Länge von 13 cm (Trenngel) und einer Stärke von 1 mm verwendet. Die Länge des Sammelgels betrug 2 cm, die Geltaschen hatten eine Breite von 7 mm. Zur präparativen Auftrennung von Proteinen wurden Gele mit einer Stärke von 2 mm und mit 15 mm breiten Geltaschen hergestellt. Proben wurden vor dem Auftragen in Auftragspuffer 3 min auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte bei konstant 150 V über 4 bis 5 h oder bei 45 V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Gemisch der folgenden Proteine aufgetragen: Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Carboanhydrase, Trypsininhibitor (Soja).

Analytische Gele wurden nach beendeter Elektrophorese 30 min in einer filtrierten Färbelösung (2.5 g SERVA Blau G in 454 ml Methanol, 92 ml Essigsäure und 454 ml Wasser) fixiert und gefärbt, anschließend 24 Stunden in einer Mischung aus 50 ml Methanol, 75 ml Essigsäure und 875 ml Wasser entfärbt. Die Gele wurde auf einem Filterpapier (Whatman 3MM) mit Hilfe eines Vakuum-Geltrockners getrocknet. Zur Autoradiographie wurden die Gele mit einem Röntgenfilm (Kodak Industrex AX) ohne Verstärkerfolie über Nacht exponiert.

8.7. Elektrophoretische Übertragung von Proteinen auf Glasfaser

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurden die Proteinbanden aus einem präparativen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf Glasfaser übertragen, die nach dem Verfahren von Aebersold et al. (1986), modifiziert nach C.

Eckerskorn (persönl. Mitteilung), vorbehandelt worden war. Dazu wurde das Gel zusammen mit dem Glasfaserpapier zwischen drei bis vier Lagen Whatman Filterpapier gelegt, das vorher mit Blottingpuffer (50 mM Natriumborat, pH 8.3, 20% Methanol) getränkt worden war. Der Transfer wurde in einem Semi-Dry Elektrobloetter von Sartorius bei konstant 150 mA für 4.5 h durchgeführt. Anschließend wurde das Glasfaserpapier in Coomassie-Lösung gefärbt, die gefärbten Banden wurden sofort ausgeschnitten und bei -70°C aufbewahrt. Das Blotten der Proteine wurde von Frau Hofmann in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Lottspeich durchgeführt.

8.8. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren des an Glasfaser gebundenen Proteins erfolgte in einem Gasphasen-Sequenzierer (Hewick et al. 1981). Die Analyse der Aminosäuresequenz wurde von Herrn Dr. F. Lottspeich nach der von ihm (1985) beschriebenen Methode ausgeführt.

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten in vivo

9.1. Substratabhängige Sauerstoffaufnahme bei *A. eutrophus*

Alcaligenes eutrophus Stämme wurden 24 h in Pyruvat-MS-Medium angezogen. 2.5 ml der Kultur wurden in 250 ml MS-Medium verdünnt, das 2,4-D, PAA, 3-CB oder Pyruvat als Kohlenstoffquellen enthielt, und 16 h bei 30°C geschüttelt. Nach Messung der optische Dichte bei 420 nm wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 4000 g (Sorvall, GSA) geerntet, dreimal in 100 ml kaltem MS-Medium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und schließlich in einer vorausberechneten Menge an MS-Medium suspendiert, so daß sich eine optische Dichte von 30 bei 420 nm ergab.

Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme lebender Zellen in Abhängigkeit vom angebotenen Substrat wurden 0.5 ml Zellsuspension mit 4.5 ml MS-Medium gemischt, das zuvor durch Luftbegasung mit Sauerstoff gesättigt worden war. Gleich nach dem Mischen wurde die Sauerstoffaufnahme ohne Substratzusatz mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode über 10 min verfolgt. Anschließend wurde das Substrat in einer Endkonzentration von 1 mM 2,4-D, 1 mM PAA, 0.2 mM 2,4-DCP oder 0.2 mM Phenol zugesetzt und der lineare Abfall der Sauerstoffkonzentration über 20 min gemessen.

9.2. Seitenkettenspaltung von 2,4-D in *Escherichia coli*

Die Abspaltung der Acetat-Seitenkette von 2,4-D durch recombinante *E. coli* Stämme, die eine aktive 2,4-D-monooxygenase exprimieren, wurde mit Hilfe eines radioaktiven Tests nachgewiesen, der auf der Methode von Amy et al. (1985) beruht. Dazu wurden die Stämme in 100 ml LB-Medium angezogen, gegebenenfalls wurde die Genexpression mit Hilfe des T7-Promotors wie unter Punkt 8.2 beschrieben induziert, und die Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 4000 g geerntet (Sorvall, GSA).

Das Zellpellet wurde in 50 ml kalter EM-Lösung suspendiert, rezentrifugiert und zuletzt in 50 ml EM-Lösung aufgenommen. Zum Test wurden 10 ml der Zellsuspension in einen 250 ml Warburgkolben überführt, der als Vorlage 10 ml der folgenden Lösung enthielt: 75 mM CaCl_2 , 0.5% Glucose, 10 mM MOPS, pH 6.5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 2,4-D und 0.1 μCi 2,4-Dichlorphenoxy(2- ^{14}C)essigsäure. Der Kolben wurde sofort gasdicht verschlossen und 1 bis 16 h bei 21°C leicht geschüttelt (80 rpm). Anschließend wurden 0.5 ml 2-Phenylethylamin in das zentrale Gefäß des Kolbens pipettiert. Die Reaktion wurde durch Injektion von 2 ml 1 N Schwefelsäure in die Zellsuspension gestoppt. Die anschließende Inkubation des verschlossenen Ansatzes bei 21°C und leichtem Schütteln überführte freigesetztes $^{14}\text{CO}_2$ in das 2-Phenylethylamin. Nach 60 min wurde die so eingefangene Radioaktivität in 5 ml rotiszint 22 (Roth, Karlsruhe) aufgenommen und in einem Szintillationszähler gemessen.

10. DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Basensequenz erfolgte mit Hilfe rekombinanter M13-Phagen nach der Didesoxynukleotidmethode von Sanger et al. (1977).

10.1. Unidirektionale Deletion mittels Exonuklease III

Da in einer Sequenzreaktion nach der Methode von Sanger et al. (1977) durchschnittlich 200 bis 300 Basen bestimmt werden können, wurde zunächst durch gerichtete Deletionen an rekombinanten M13-Phagen nach der Methode von Henikoff (1984) eine Serie von unterschiedlich verkürzten Phagen hergestellt, die es erlaubten, durch überlappende Sequenzierung die Basensequenz von längeren DNA-Abschnitten zu ermitteln.

Dazu wurden 10 µg doppelsträngiger M13-DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum Startpunkt der Sequenzreaktion ein überhängendes 3'-Ende und am Beginn des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts ein überhängendes 5'-Ende erzeugten. Der Restriktionsansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die gefällte DNA wurde in 100 µl Puffer (66 mM Tris-HCl, 0.66 mM MgCl₂) aufgenommen und 10 min bei 37°C vorinkubiert. Durch Zusatz von 10 µl Exonuklease III (40 U/µl) und Mischen wurde die Reaktion gestartet. Alle 35 sec wurden jeweils 5 µl aus dem Ansatz entnommen und zum Abstoppen der Reaktion sofort mit 15 µl Salzlösung (0.2 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) gemischt. Die so erhaltenen Ansätze (je 20 µl) wurden mit 60 µl -20°C kaltem Ethanol gemischt, und 30 min bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren, Waschen und Trocknen wurde die DNA in je 90 µl S1-Puffer (0.25 M NaCl, 30 mM Kaliumacetat, pH 4.6, 1 mM ZnSO₄, 5% Glycerin) aufgenommen. Zu den Ansätzen wurden je 10 µl Mung Bean Nuclease (150 U/µl) gegeben und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde

die Reaktion durch Zusatz von je 12 µl Puffer (0.5 M Tris-HCl, 125 mM EDTA, pH 8.0) gestoppt. 6 µl jedes Ansatzes wurden zur Kontrolle der Reaktion auf einem Minigel analysiert. Zur Auffüllung eventuell vorhandener Überstehender DNA-Enden wurden die Ansätze mit DNA-Polymerase I behandelt und anschließend ligiert, wie bereits unter Punkt 7.8.2 beschrieben wurde. Anschließend wurden kompetente Zellen von E. coli JM101 mit je 20 µl der Ligationsansätze transformiert (Punkt 7.9).

10.2. Isolierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA

Die unter Punkt 10.1. erhaltenen Phagenplaques wurden mit einer Pasteurpipette ausgestochen. Je 1.6 ml einer 1 : 100 verdünnten Kultur von E. coli JM101 in TY-Medium wurden mit einem Plaque infiziert und 5 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min bei 10000 g abzentrifugiert (Eppendorf-System) und der Überstand in ein frisches Gefäß abgegossen. Das Zellpellet wurde durch Absaugen von restlicher Flüssigkeit befreit und bis zur späteren Isolierung der doppelsträngigen DNA (Punkt 6.1) bei -20°C aufbewahrt. Der Überstand wurde erneut 5 min zentrifugiert und dann in ein frisches Gefäß gegossen, das 200 µl PEG-Lösung (20% PEG 6000, 2.5 M NaCl) enthielt. Der Ansatz wurde gut gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Zentrifugationsüberstands wurde das bereits sichtbare Phagenpellet nochmals 2 min zentrifugiert, dann sorgfältig von verbleibenden Flüssigkeitsresten befreit und schließlich in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung der Phagenproteine wurde mit 50 µl Phenol gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 50 µl Chloroform gemischt und 5 min zentrifugiert. Die abgetrennte wäßrige Phase wurde mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 250 µl -20°C kaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Die gefällte Einzelstrang-DNA wurde 10 min bei 4°C und 10000 g abzentrifugiert, mit 1 ml -20°C kaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

10.3. Sequenzreaktion nach der Didesoxynukleotidmethode

10.3.1. Herstellung der Stammlösungen

Desoxynukleotidmischungen wurden routinemäßig nach folgendem Schema zusammengestellt:

	A°	C°	G°	T°
0.5 mM dCTP	30 µl	2 µl	40 µl	40 µl
0.5 mM dGTP	30 µl	40 µl	2 µl	40 µl
0.5 mM dTTP	30 µl	40 µl	40 µl	2 µl
TE-Puffer	30 µl	40 µl	40 µl	40 µl

Die Konzentration der Didesoxynukleotid-Lösungen (ddNTP) wurde individuell je nach dem Ergebnis der Sequenzreaktionen optimiert. Wenn auf dem Elektrophoresegel überwiegend kurzkettige Fragmente auftraten, wurde die Konzentration des betreffenden ddNTPs auf die Hälfte reduziert. Bei einem Überschuß an langkettigen Fragmenten wurde sie verdoppelt. Zuletzt wurden die folgenden Stammlösungen verwendet: 66 µM ddATP; 33 µM ddCTP; 100 µM ddGTP; 500 µM TTP.

Desoxy-/Didesoxynukleotidmischungen (A*, C*, G*, T*) wurden hergestellt, indem jeweils ein Volumen einer Desoxynukleotidmischung A°, C°, G° oder T° mit dem gleichen Volumen der entsprechenden Didesoxynukleotidlösung gemischt wurde.

10.3.2. Primerannealing und Polymerasereaktion

7.5 µl einzelsträngige Phagen-DNA wurden mit 1.5 µl Klenow-Puffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M MgCl₂, pH 8.0) und 1.0 µl M13-Primer gemischt und unter mehrmaligem Abzentrifugieren 1 bis 2 h bei 55 bis 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1 µl (α -³⁵S)dATP und 2 µl DNA-Polymerase I (1 U/µl) zugesetzt. Je 3 µl dieser Mischung wurden auf den Boden von vier vorher gekennzeichneten

Eppendorfgefäßen pipettiert, die daraufhin in einer Zentrifuge plaziert wurden. An die Wand jedes Gefäßes wurden 2 µl der vier Nukleotidmischungen, A*, C*, G* bzw. T* pipettiert und die Reaktionen wurden durch kurzes Abzentrifugieren der Tropfen gestartet. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden in gleicher Weise je 2 µl dNTP-Lösung (0.125 mM dATP, 0.125 mM dCTP, 0.125 mM dGTP, 0.125 mM dTTP) zugesetzt und mit den Ansätzen durch Herunterzentrifugieren vermischt (Chase-Reaktion). Nach weiteren 15 min Inkubation wurden je 4 µl Formamid-Farblösung an die Wand jedes Gefäßes pipettiert und durch kurzes Herabzentrifugieren wurden die Reaktionen gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

10.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von Oligonukleotiden

Die Gelelektrophorese der DNA-Sequenzierproben erfolgte mit Hilfe von Harnstoff/Polyacrylamid-Keilgelen in TBE-Puffer.

10.4.1. Vorbehandlung der Elektrophoreseplatten

Für die Qualität des sehr dünnen Gels war die Behandlung der beiden Elektrophoreseplatten (Glasplatte und Thermostatisierplatte) von entscheidender Bedeutung. Die Glasplatte wurde zur kovalenten Anbindung des Gels mit Bindsilan behandelt. Dazu wurde sie gründlich von Gelresten befreit, mit Seife gewaschen, erst mit Leitungswasser, dann mit demineralisiertem Wasser gespült und mit einem Papiertuch trockengerieben. Anschließend wurden 5 ml 0.5 N NaOH auf der Platte verteilt. Nach dem Antrocknen der Lösung wurde die Platte gründlich gespült und trockengerieben. Nach zweimaligem Abreiben mit 2-Propanol und anschließendem Polieren wurde die frisch bereitete Bindsilanlösung (17.5 µl Methacryloxypropyltrimethylsilan, 175 µl 10% Essigsäure, 5 ml Ethanol) auf der Platte verteilt. Nach 5 min Einwirkungsdauer wurde die Platte nochmals mit 2-Propanol abgerieben und gründlich poliert.

Die Thermostatisierplatte wurde zu Beginn ihrer Benutzung einmal gründlich silikonisiert. Dazu wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen, gespült und mit NaOH behandelt. Dann wurden 5 ml Dimethyldichlorsilan auf der Platte verteilt, nach 5 min Einwirkungsdauer wurde die Platte gründlich mit 2-Propanol abgewaschen und poliert. Zwischen den Läufen wurde die Thermostatisierplatte nur mit Seife, Wasser und 2-Propanol behandelt, da sich zu häufiges Silikonisieren als nachteilig für die Qualität der Gele erwies.

10.4.2. Herstellung der Gele

50 ml Gellösung wurden aus 7.5 ml Acrylamid-Stocklösung (38% Acrylamid, 2% Bis, 30 min lang entionisiert über 5% Amberlite MB1), 21 g Harnstoff, 5 ml 10-fach TBE-Puffer und 22 ml Wasser gemischt, nach dem Lösen des Harnstoffs filtriert (0.45 μm) und zum Start der Polymerisation mit 400 μl 10% Ammoniumpersulfat und 20 μl TEMED gemischt. Zur Ausbildung eines keilförmigen Geles wurden auf beiden Seiten vier Spacer der Stärke 0.1 mm und der Längen 30 cm, 20 cm, 10 cm und 52 cm in der angegebenen Reihenfolge so übereinandergelegt, daß sich eine zum Gelende hin ansteigende Dicke von 0.1 bis 0.4 mm ergab. Das Gießen des Gels erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers. Anstelle eines Kammes wurde am oberen Ende des Gels ein glatter, 0.1 mm dicker Spacer eingesetzt.

10.4.3. Elektrophoresebedingungen

In der betriebsbereiten Apparatur wurde das Gel 30 min auf 55-65°C thermostatisiert und dabei einem Vorlauf bei 2000 V unterzogen. Kurz vor dem Auftagen der Proben wurde ein Sägezahnkamm (Zahnabstand 6.8 mm) auf das Gel gesetzt. Die Proben (Punkt 10.3.2.) wurden 3 min auf 95°C erhitzt und sofort mittels einer Mikrokapillare (0.1 mm) in die gründlich ausgesöulten Kammzwischenräume pipettiert (1 bis 4 μl).

Nach dem Auftragen jeder Probe wurde ca. 1 min Strom angelegt, bis der Farbstoff 1 cm eingedrungen war. Der Trennlauf wurde bei konstant 2000 V (30 bis 40 mA) durchgeführt bis die untere Farbstoffbande das Gelende erreichte.

10.4.4. Fixieren, Trocknen und Autoradiographie der Gele

Nach dem Lauf wurde die Glasplatte mitsamt dem Gel von der Thermostatisierplatte gelöst und zum Fixieren 20 min in 10% Essigsäure gelegt. Anschließend wurde sie 30 sec gründlich mit Leitungswasser und dann kurz mit demineralisiertem Wasser gespült und schließlich 2 h bei 80°C getrocknet. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm (Kodak XAR-5) auf dem Gel fixiert und 24 bis 48 h exponiert.

10.5. Computeranalyse der Sequenzdaten

Die von den Autoradiogrammen abgelesenen Sequenzen wurden mit Hilfe des von Queen und Korn (1984) entwickelten Computerprogramms zur Sequenz des gesamten DNA-Abschnitts zusammengesetzt und mit der Sequenz des Gegenstranges verglichen. Außerdem wurde dieses Programm zum Auffinden von Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, zur Translation in Aminosäuresequenzen und zur Homologiesuche in Datenbanken verwendet. Ebenfalls zur Homologiesuche in Datenbanken, ferner zur Vorhersage von Sekundärstrukturen für Proteine wurden die Programme PIR (Protein Identification Resource, NBRF, Washington DC, M.O. Dayhoff) und UWGCG (University of Wisconsin, Genetic Computer Group, J. Devereux) am Rechenzentrum des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried benutzt. Die genannten Programme beinhalteten die Datenbanken "GenBank" und "EMBL" für DNA-Sequenzen, sowie die "NBRF"-Datenbank für Proteinsequenzen.

III. ERGEBNISSE

1. Erzeugung von transposoninduzierten Mutationen in *tfdA*

1.1. Transposonmutagenese mit Tn5

Ein gebräuchliches Mittel zur Erforschung der genetischen Grundlagen von Stoffwechselwegen bei Gram-negativen Bakterien ist die Transposonmutagenese. Eine Mutagenese durch Transposoninsertion, wie sie auch von Don et al. (1985) zur Identifizierung von Genen des 2,4-D-Metabolismus in Alcaligenes eutrophus JMP134 verwendet wurde, sollte nun Aufschluß über die Lage des bisher nicht identifizierten Gens *tfdA* geben, das den ersten Schritt im Abbau von 2,4-D kodiert. Für eine derartige zufallsgesteuerte Mutation erwies sich nach bisherigen Erkenntnissen das Transposon Tn5 als besonders geeignet, da Tn5 im Gegensatz zu anderen Transposonarten relativ sequenzunspezifisch in das Genom integriert wird.

Mit dem mobilisierbaren Tn5-Trägerplasmid pSUP2021 und dem mobilisierenden Stamm E. coli S17-1 stand ein gut erprobtes System für die Tn5-Mutagenese zur Verfügung (Simon et al. 1983b). S17-1 trägt die konjugativen (Tra) Funktionen des IncP1 Plasmids RP4 in seinem Chromosom und ist deshalb in der Lage, Plasmide mit einer für die Mobilisierung spezifischen DNA-Sequenz (Mob-Funktion) konjugativ auf andere Gram-negative Bakterien zu übertragen. pSUP2021 stellt ein Derivat des Plasmids pBR325 dar, in dem eine für IncP spezifische Mob-DNA und das für eine Km-Resistenz kodierende Transposon Tn5 integriert sind. Wird nun das Plasmid pSUP2021 konjugativ in andere Gram-negative Stämme übertragen, in denen es aufgrund seines für E. coli spezifischen ColE1 Replikationsursprungs nicht als selbständiges Replikon existieren kann, so können durch Selektion auf Km-

Resistenz Stämme mit einem in das Wirtsgenom integrierten Tn5 isoliert werden.

Das Medium zur Selektion der Transposonmutanten enthielt neben Minimalsalzen Fructose als C-Quelle und eine hohe Konzentration an Km (380 µg/ml). Durch die Verwendung von Fructose-Minimalmedium wurde der auf Vollmedium auftretende Anteil an auxotrophen Mutanten sowie solchen mit Mutationen in der Fructoseverwertung eliminiert und damit bereits eine Vorselektion nichtletaler Mutationen ausgeführt. Die hohe Km-Konzentration garantierte zusätzlich zum Gebrauch des Minimalmediums eine Gegenselektion des Donorstammes, da die Tn5-kodierte Km-Resistenz in E. coli nur gegen niedrigere Konzentrationen wirksam ist.

Die Km-resistenten Transkonjuganten wurden anschließend mit Wachstumstests auf 2,4-D-Minimalmedium und 2,4-D-Indikatormedium daraufhin untersucht, ob durch die Insertion des Transposons eine Mutation im 2,4-D-Metabolismus stattgefunden hatte. Von den ca. 1000 getesteten Stämmen hatten acht die Eigenschaft verloren, 2,4-D als C-Quelle zu nutzen (Tfd⁻-Phänotyp). Das entsprach einer Häufigkeit von 0.8%, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen bei der Tn5-Mutagenese vergleichbarer Stoffwechselwege gefunden wurde (B. Friedrich, persönl. Mitteilung).

1.2. Identifizierung von Plasmidmutanten durch in vivo-Transfer

Da alle für den 2,4-D-Abbau verantwortlichen Gene auf dem Plasmid pJP4 vermutet wurden, sollten die Tfd⁻-Mutanten eine Tn5-Insertion in pJP4 aufweisen. Um das zu untersuchen, wurde die Übertragbarkeit der von Tn5 kodierten Km-Resistenz mit Hilfe der konjugativen Eigenschaften von pJP4 getestet. Die acht Mutanten wurden mit E. coli HB101 gekreuzt und Transkonjuganten wurden auf Km-Resistenz selektiert. Da HB101 eine chromosomal bedingte Sm-Resistenz

aufweist, konnte eine hohe Konzentration von Sm im Medium (400 µg/ml) zur Gegenselektion gegen den Donor verwendet werden. Der Transferversuch zeigte, daß alle acht Tn5-Mutanten in der Lage waren, ihre Km-Resistenz konjugativ auf E. coli HB101 zu übertragen. Sie enthielten somit Transposoninsertionen im Plasmid pJP4. Durch einen Rücktransfer der Tn5 enthaltenden pJP4-Derivate in den plasmidfreien A. eutrophus JMP222 konnte außerdem nachgewiesen werden, daß tatsächlich Plasmidmutationen für den Verlust des 2,4-D-Abbaus verantwortlich waren. Anderenfalls hätte eine Übertragung in JMP222 zur Rekonstruktion eines intakten 2,4-D-Weges führen müssen.

1.3. Bestimmung der spezifischen Gendefekte

Unter den vorhandenen Tfd⁻-Mutanten sollten solche identifiziert und näher charakterisiert werden, welche eine Mutation im Gen tfdA, dem ersten Gen des metabolischen Weges von 2,4-D aufwiesen. Dazu wurden die Mutanten auf die Verwertung von Substraten untersucht und anhand der gefundenen Gendefekte verschiedenen Mutationsklassen zugeordnet.

1.3.1. Wachstumstests auf 3-Chlorbenzoat

Zur groben Unterscheidung der Mutationen des oberen Abschnitts des 2,4-D-Abbauweges (Abbildung 2, A und B) von solchen der nachfolgenden Schritte C, D, E und F bot sich zunächst ein Test auf Verwertung von 3-CB als Wachstums-substrat an. Die beiden Abbauwege von 3-CB und 2,4-D besitzen nämlich jeweils eigene Gene für die ersten beiden Schritte und münden ab dem dritten Schritt, der Chlorcatechol-1,2-dioxygenase Reaktion, in den gemeinsamen Weg der ortho-Spaltung. Mutationen in den ersten beiden Genen des 2,4-D-Abbaus lassen deshalb den 3-CB-Weg unbeeinflusst (Tcb⁺), während solche in den Genen C, D, und E einen Verlust der 3-CB-Verwertung zur Folge haben (Tcb⁻).

Gen tfdF nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es offensichtlich nicht für den 3-CB-Abbau und nur bedingt für den 2,4-D-Abbau nötig ist (Don et al. 1985). Von den acht Mutanten zeigten vier Mutanten Wachstum auf 3-CB-Minimalmedium und konnten damit den Mutationsklassen A, B oder F zugeordnet werden (Tabelle 5).

1.3.2. Enzymtests auf Umsetzung von 2,4-D und 2,4-DCP

Zur Unterscheidung der Mutationsklassen A, B und F wurden Messungen des Sauerstoffverbrauchs der Zellen in Abhängigkeit vom angebotenen Substrat 2,4-D oder 2,4-DCP (2,4-Dichlorphenol) herangezogen, wodurch die Aktivitäten der beiden ersten 2,4-D-abbauenden Enzyme, 2,4-D-monooxygenase und 2,4-DCP-hydroxylase, charakterisiert werden konnten. Die Zellen wurden dazu in Minimalmedium angezogen, als Kohlenstoffquelle diente Pyruvat, da diese Verbindung eine sehr geringe Katabolitrepression bewirkt. Die Stämme wurden zugleich unter induzierenden und unter nicht induzierenden Bedingungen angezogen, um Mutationen in der Regulation des Abbauweges von den Strukturgenmutationen unterscheiden zu können. Als Induktor kam sowohl 2,4-D als auch 3-CB in Frage, da beide Substrate alle für den 2,4-D-Abbau verantwortlichen Gene einschließlich der ersten beiden Gene tfdA und tfdB induzieren (Don et al. 1985). Gegenüber 2,4-D hat 3-CB jedoch den Vorteil, daß sich bei der Anzucht von tfdB-Mutanten in Anwesenheit von 3-CB nicht das 2,4-DCP akkumuliert, das aus 2,4-D in der 2,4-D-monooxygenase-Reaktion gebildet wird.

Aus den Messungen mit der Sauerstoffelektrode ging hervor, daß unter den vier getesteten Mutanten zwei Stämme keine induzierbare 2,4-D-monooxygenase-aktivität mehr besaßen. Die 2,4-DCP-hydroxylase dieser Mutanten war wie beim Wildtyp durch 3-CB induzierbar, so daß eine Mutation der Genregulation ausgeschlossen werden konnte (Tabelle 6).

Tabelle 5 Mutationsklassen des 2,4-D-Abbaus mit dazugehörigen Enzymdefekten und Wachstumseigenschaften.

Klasse	Wachstum auf		Enzymdefekt
	2,4-D	3-CB	
A	-	+	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-monooxygenase
B	-	+	2,4-Dichlorphenol-hydroxylase
C	-	-	Chlorcatechol-1,2-dioxygenase
D	-	-	Chlormuconat-cycloisomerase
E	-	-	4-Carboxymethylen-2-en-4-olid (dienlacton)hydrolase
F	+/-	+	<u>trans</u> -Chlordienlacton-isomerase

Tabelle 6

Bestimmung der Substratverwertung lebender Zellen von Tfd⁻/Tcb⁺-Mutanten mit Hilfe der Sauerstoffelektrode. Die angegebenen relativen Aktivitäten beziehen sich auf eine Zellsuspension von OD(420nm)=3 und bezeichnen den Sauerstoffverbrauch in % pro Minute (Sättigungskonzentration = 100%). In Klammern sind die Werte für die nicht induzierten Kulturen angegeben.

Stamm	Induktor	Aktivität (% x min ⁻¹)	
		2,4-DCP	2,4-D
JMP134(Wildtyp)	3-CB	9.6	16.0
	-	(0.9)	(2.0)
JMP134:Tn5-2	3-CB	7.9	0
	-	(1.4)	(0)
JMP134:Tn5-4	3-CB	8.1	0
	-	(1.5)	(0)

Somit waren die Mutanten JMP134:Tn5-2 und JMP134:Tn5-4 dem gesuchten Mutationstyp A zuzuordnen. Die beiden anderen Stämme zeigten sowohl 2,4-D-monooxygenase- als auch 2,4-DCP-hydroxylase-Aktivität nach Induktion mit 3-CB, und waren vermutlich zur Mutationsklasse F zu rechnen, da sie auch eine für diese Klasse typisches Wachstumsverhalten aufwiesen. Tabelle 7 faßt die aus den Wachstumstests und der Substratverwertung gewonnenen Erkenntnisse zusammen und ordnet die Mutanten den von Don et al. (1985) beschriebenen Mutationsklassen zu.

Tabelle 7 Zuordnung der transposoninduzierten Tfd⁻-Mutanten zu den verschiedenen Mutationsklassen (vgl. Abbildung 2).

Tn5-Mutante	Wachstum auf 3-CB	Wachstum auf 2,4-D	Mutations- klassen
JMP134-2012A1	-	-	C, D od. E
JMP134-1812B2	-	-	C, D od. E
JMP134-4711A	-	-	C, D od. E
JMP134-1812C	-	-	C, D od. E
JMP134-1812B1	+++	+/-	F
JMP134-1812B2	+++	+/-	F
JMP134-Tn5-2	+++	-	A
JMP134-Tn5-4	+++	-	A
JMP134	+++	+++	Wildtyp

1.4. Charakterisierung der Mutanten durch Restriktions- analyse

Insertionen von Transposon Tn5 in Plasmiden lassen sich im Allgemeinen durch Restriktionsanalyse lokalisieren, indem Restriktionsverdau der transposonhaltigen Plasmide elektrophoretisch mit denen des Wildtypplasmids verglichen werden. Im Falle von Tn5-Insertionen ist das Restriktionsenzym EcoRI dazu am besten geeignet, da Tn5 selbst keine EcoRI-Stelle besitzt und somit das von der Insertion betroffene EcoRI-Wildtypfragment um etwa 6 kb vergrößert.

Die aus den tfdA-Mutanten isolierten Plasmide pJT2 aus JMP134:Tn5-2 und pJT4 aus JMP134:Tn5-4, sowie das Wildtypplasmid pJP4 wurden mit EcoRI verdaut und elektrophoretisch analysiert. Bei pJT2 zeigte sich eine Insertion von Tn5 im pJP4-Fragment E (8.0 kb), das dadurch eine Größenzunahme auf 14 kb erfuhr. Zusätzlich zu der erwarteten Vergrößerung eines Fragmentes hatten jedoch Deletionen und/oder Umstellungen von DNA-Fragmenten stattgefunden, welche die EcoRI-Fragmente C (10.6 kb), G (1.9 kb), H (1.7 kb) und I (1.2 kb) betrafen (Tabelle 8). Noch größere Deletionen als in pJT2 wurden im Plasmid pJT4 festgestellt, so daß hier eine Zuordnung der Fragmente und damit eine Lokalisation von Tn5 anhand einer Restriktionsanalyse unmöglich war. Da bei beiden Plasmiden sowohl Transposoninsertionen als auch Deletionen für den Defekt im Gen tfdA verantwortlich sein konnten, konnte mit Hilfe der hier gewonnenen Erkenntnisse keine eindeutige Aussage über die Lage von tfdA gemacht werden.

Tabelle 8

EcoRI-Restriktionsfragmente des Wildtyp-plasmids pJP4 und des Tn5-Mutantenplasmids pJT2.

Bande	pJP4xEcoRI	pJT2xEcoRI
A	29 kb	29 kb
B	15 kb	15 kb
	-	14 kb
C	11 kb	-
D	10 kb	10 kb
E	8 kb	-
	-	7.4 kb
F	3 kb	3 kb
G	1.9 kb	-
H	1.7 kb	-
I	1.2 kb	-
Summe:	80.8 kb	78.6 kb

2. Klonierung von Genen des 2,4-D-Abbaus in E. coli

Durch die Isolierung der transposoninduzierten tfdA-Mutanten A. eutrophus JMP134:Tn5-2 und JMP134:Tn5-4 war die Möglichkeit gegeben, klonierte Fragmente von pJP4 auf die Komplementation der Mutation zu testen um damit das Gen tfdA auf einem der rekombinanten Plasmide zu lokalisieren. Als Vektoren zur Klonierung in E. coli und zum konjugativen Transfer in die Mutanten sollten mobilisierbare Plasmide mit breitem Wirtsbereich (broad host range) dienen. Die rekombinanten Plasmide sollten dann mit Hilfe der im Stamm E. coli S17-1 zusätzlich vorhandenen Transfer-(Tra)-Funktionen konjugativ auf den betreffenden Gram-negativen Rezipienten übertragen werden und sich dort eigenständig replizieren.

2.1. Konstruktion von rekombinanten Plasmiden

Don et al. (1985) berichteten über die Expression von Genen des 2,4-D-Abbaus durch ein kloniertes 15 kb EcoRI-Fragment von pJP4 in einem pJP4-freien A. eutrophus-Stamm. Dabei war nicht eindeutig geklärt worden, ob das Gen tfdA auf dem klonierten Fragment enthalten war. Amy et al. (1985) stellten mit Hilfe eines radioaktiven in vivo-Enzymtests fest, daß ein rekombinantes Plasmid mit dem 21 kb HindIII-Fragment von pJP4 in der Lage ist, in E. coli die Seitenketten-Spaltung des 2,4-D zu exprimieren. Beide Fragmente wiesen aufgrund ihrer Herkunft von pJP4 eine überlappende DNA-Region von 4 kb auf und umfaßten gemeinsam einen Anteil von 40% (32 kb) des Plasmids pJP4. Welches der beiden Fragmente das Gen tfdA enthält und damit in der Lage ist die tfdA-Mutationen der beiden Transposonmutanten zu komplementieren, sollte nun durch Transferversuche untersucht werden.

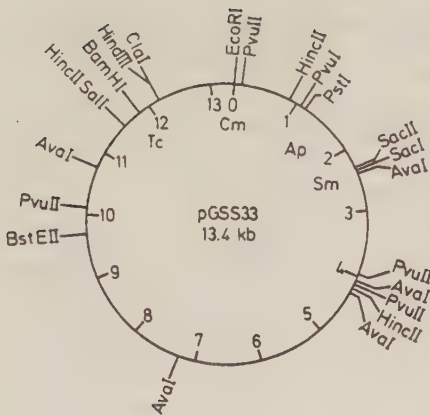


Abbildung 3

Restriktionskarte des broad-host-range Vektor-Plasmids pGSS33 (nach Sharpe 1984).

Als Vektoren für die Klonierung und den Transfer des 15 kb großen EcoRI-Fragments und des 21 kb großen HindIII-Fragments aus pJP4 wurden zwei broad host range Plasmide aus unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen verwendet. Der Vektor pGSS33 (Abbildung 3) gehört zur IncQ-Gruppe und trägt Resistenzgene für Tc, Cm, Ap und Sm, der Vektor pVK101 gehört der IncP-Gruppe an und kodiert Resistenzen gegen Tc und Km. Durch die unterschiedlichen Vektoren sollten einerseits negative Effekte vermieden werden, die auf Inkompatibilität mit dem Wirtsorganismus beruhen könnten, andererseits sollte damit auch ein gemeinsamer Transfer beider Fragmente in einen Alcaligenes-Stamm möglich sein. Da die sogenannte shotgun-Ligation von DNA-Fragmenten direkt aus dem Restriktionsverdau von pJP4 zur Klonierung eines überproportionalen Anteils kleiner Fragmente und damit zu Schwierigkeiten bei der Klonierung der großen EcoRI- und HindIII-Fragmente geführt hätte, wurden die betreffenden Fragmente nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung aus einem bei niedriger Temperatur schmelzenden Agarosegel isoliert und mit den EcoRI- bzw. HindIII-geschnittenen Vektoren ligiert. Der EcoRI-geschnittene Vektor pVK101 mußte vorher zusätzlich mit Phosphatase behandelt werden, da für eine EcoRI-Klonierung in diesem Plasmid keine In-

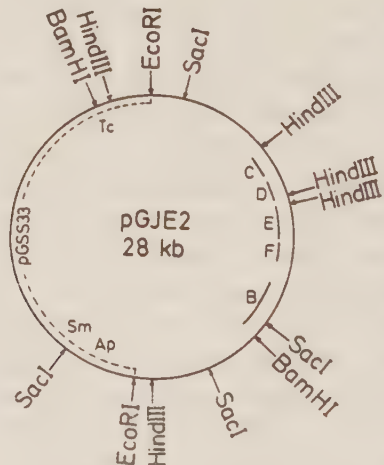
Tabelle 9 Identifizierung rekombinanter broad-host-range Plasmide.

Rekombinantes Plasmid	Vektor	Insert	Identifizierung
pGJE2	pGSS33	15 kb EcoRI-Fragm. v.pJP4	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^S ,
pVJE21/pVJE22	pVK101	15 kb EcoRI-Fragm. v.pJP4	Tc ^r , Km ^r ,
pGJH21/pGJH22	pGSS33	21 kb HindIII-Fragm. v.pJP4	Tc ^S , Cm ^r , Ap ^r ,
pVJH21/pVJH22	pVK101	21 kb HindIII-Fragm. v.pJP4	Tc ^r , Km ^S ,

aktivierung einer Antibiotikaresistenz zur Identifizierung der rekombinanten Plasmide zur Verfügung stand. Der mobilisierende E. coli Stamm S17-1 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert und Klone mit hybriden Plasmiden wurden zunächst anhand ihrer Resistenzmarker identifiziert (Tabelle 9) und anschließend durch Restriktionsanalyse charakterisiert (Punkt 2.3).

Abbildung 4

Rekombinantes Plasmid, bestehend aus dem 15 kb EcoRI-Fragment von pJP4 und dem broad-host-range Vektor pGSS33. Das Fragment enthält die Gene *tfdB* bis *tfdF* des 2,4-D- und 3-CB-Abbaus. Es vermittelt in *A. eutrophus* JMP222 die Fähigkeit zum Wachstum auf 3-Chlorbenzoesäure (3-CB).



2.2. Identifizierung von Tfd-Genen durch Transfer-experimente

2.2.1. Gene des Chlorcatechol-Abbaus

Die hybriden Plasmide mit dem 15 kb EcoRI-Insert pGJE2 (Abbildung 4), pVJE21 und pVJE22 (Abbildung 5) wurden zunächst durch Konjugation in den pJP4-freien Stamm A. eutrophus JMP222 transferiert. Transkonjugante Stämme wurden auf 3-CB- und 2,4-D-haltigen Minimalmedien ausgestrichen. Nach mehreren Tagen Inkubation zeigten sich bei Stämmen mit den drei genannten Plasmiden Kolonien auf 3-CB-Medium, während auf 2,4-D-Medium kein Wachstum zu erkennen war. Die Kolonien auf 3-CB färbten sich stark braun, was auf den Verlust der Abbaufunktionen und der damit verbundenen Anhäufung toxischer Metabolite (Chlorcatechole) des 3-CB-Weges hinwies. Die Gene für die ortho-Spaltung der Chlorcatechole (Gene tfdC, tfdD, tfdE und tfdF) waren somit auf dem klonierten 15 kb EcoRI-Fragment vorhanden und funktionsfähig, die Funktionen A und B des 2,4-D-Abbauweges (Abbildung 2) wurden jedoch nicht exprimiert. Mögliche Ursachen dafür konnten im Fehlen von Genen für die Regulation dieser Schritte, für den Transport von 2,4-D, oder im Fehlen des Gens tfdA selbst liegen.

2.2.2. Gen tfdA des 2,4-D-Abbaus

Durch Komplementation der transposoninduzierten tfdA-Mutanten, bei denen alle übrigen Funktionen des 2,4-D-Abbaus intakt waren, sollte es möglich sein, ein tfdA-Gen auf einem der klonierten Fragmente zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide mit dem 15 kb EcoRI-Insert (pGJE2, pVJE21, pVJE22) und die Plasmide mit dem 21 kb HindIII-Insert (pGJH21, pGJH22, pVJH21, pVJH22) durch Konjugation in die A. eutrophus-Mutanten JMP134:Tn5-2 und JMP134:Tn5-4 übertragen. Bei direkter Selektion von Transkonjuganten auf 2,4-D-haltigem Minimalmedium, zeigten sich



Abbildung 5 Rekombinante Plasmide, bestehend aus dem 15 kb EcoRI-Fragment von pJP4 und dem broad-host-range Vektor pVK101. Die Plasmide vermitteln in *A. eutrophus* JMP222 die Fähigkeit zum Wachstum auf 3-Chlorbenzoesäure.



Abbildung 6 Rekombinante Plasmide, bestehend aus dem 21 kb HindIII-Fragment aus pJP4 und dem broad-host-range Vektor pGSS33. Die Plasmide komplementieren Mutationen im Gen tfdA.

in allen Transferexperimenten, an denen das 21 kb HindIII-Fragment beteiligt war, nach 10 bis 14 Tagen einzelne Kolonien mit einem dem Wildtyp vergleichbaren Wachstum, während Plasmide mit dem 15 kb EcoRI-Fragment keine Komplementation ergaben.

In einem anderen Versuch wurde das Plasmid pGJH22 mit dem HindIII-Fragment mit Hilfe von E. coli S17-1 in einen Stamm von A. eutrophus JMP222 übertragen, der bereits das Plasmid pVJE21 mit dem EcoRI-Fragment enthielt. Bei der Selektion auf 2,4-D-Medium entwickelten sich Kolonien aus den Kreuzungen beider Stämme, während der Rezipientenstamm allein kein Wachstum zeigte. Durch die beiden Transferversuche wurde klar, daß das Gen tfdA auf dem HindIII-Fragment lokalisiert war, und daß das 21 kb HindIII-Fragment und das 25 kb EcoRI-Fragment zusammen alle für eine Expression des 2,4-D-Abbaus notwendigen Strukturgene (tfdA bis tfdF) enthielten.

2.3. Physikalische Charakterisierung der rekombinanten Plasmide

Die rekombinanten Plasmide mit dem EcoRI- und dem HindIII-Fragment von pJP4 wurden durch Lokalisation der Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI, HindIII und BamHI näher charakterisiert. Die Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen die Restriktionskarten von pGJE2, pVJE21/22 und pGJH21/22. Da eine Kartierung des 21 kb HindIII-Fragments mit einem weiteren Restriktionsenzym für die beabsichtigte Klonierung von tfdA wünschenswert war (Punkt 3), eine exakte Kartierung der broad host range Plasmide pGJH21/22 und pVJH21/22 jedoch aufgrund ihrer Größe von 35 und 42 kb mit Schwierigkeiten verbunden war, wurde das 21 kb HindIII-Fragment aus pVJH22 in den wesentlich kleineren Vektor pUC19 umkloniert, der zudem den Vorteil einer hohen Kopienzahl in E. coli und damit einer hohen Ausbeute bei der Plasmidisolierung bot.

Die beiden Plasmide pUC19 und pVJH22 wurden zunächst mit HindIII verdaut und anschließend miteinander ligiert. Kompetente Zellen von E. coli JM83 wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und Transformanten wurden auf Ap-Agar-medium selektiert, das einen Zusatz von X-Gal enthielt, wodurch rekombinante Klone anhand ihrer fehlenden Blaufärbung (lacZ-Inaktivierung) identifiziert werden konnten. Um die aus den beiden Vektoren pUC19 und pVK101 gebildeten hybriden Plasmide auszusondern, wurden die Klone anschließend auf den Verlust der Tc-Resistenz getestet. Mit Hilfe des aus pUC19 und dem 21 kb HindIII-Fragment gebildeten hybriden Plasmids pUJH2 wurde dann eine genaue Karte des HindIII-Fragments bezüglich der Restriktionsenzyme EcoRI, BamHI und SacI angefertigt (Abbildung 7).

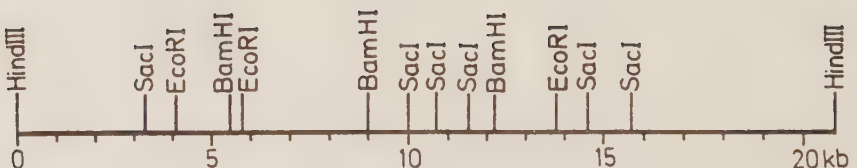


Abbildung 7 Restriktionskarte des 21 kb HindIII-Fragments aus pJP4 für die Enzyme HindIII, SacI (=SstI), EcoRI und BamHI.

3. Klonierung des Gens *tfdA* auf einem 3 kb *SacI*-Fragment von pJP4

Nach dem gleichen Verfahren, das die Komplementation der *tfdA*-Mutanten durch das 21 kb *HindIII*-Fragment ermöglicht hatte (Punkt 2.2), sollten nun Subfragmente des *HindIII*-Fragments kloniert und auf die Expression von *tfdA* getestet werden. Um das Gen auf einem der rekombinanten Plasmide möglichst vollständig zu erhalten, mußten dazu mit verschiedenen Restriktionsenzymen ausreichend große und überlappende Subfragmente erzeugt werden. Wie aus der in Abbildung 7 dargestellten Restriktionskarte des *HindIII*-Fragments hervorgeht, erfüllten die Schnittstellen für die drei Restriktionsenzyme *EcoRI*, *BamHI* und *SacI* diese Bedingung.

3.1. Konstruktion von rekombinanten Plasmiden mit *SacI*

Ein Restriktionsverdau des Plasmids pVJH21 mit dem Enzym *SacI* wurde im Shot-gun-Verfahren mit dem *SacI*-geschnittenen broad host range Vektor pGSS33 (Abbildung 3) ligiert. Zur Transformation wurde zunächst der Stamm *E. coli* LE392 verwendet, der besser als der mobilisierende Stamm *E. coli* S17-1 für eine *SacI*-Klonierung in pGSS33 geeignet war. S17-1 enthält nämlich das Transposon Tn7 und damit dessen Sm-Resistenzgen, LE392 dagegen ist Sm-sensitiv und ermöglicht die Erkennung von Transformanten mit rekombinanten Plasmiden über eine Inaktivierung der plasmidkodierten Sm-Resistenz von pGSS33. Aus den Transformanten von *E. coli* LE392 wurden Plasmide mit verschiedenen von pJP4 stammenden *SacI*-Fragmenten isoliert, anhand von Restriktionsanalysen charakterisiert und anschließend durch Transformation in den mobilisierenden Stamm S17-1 überführt.

3.2. Identifizierung des Gens *tfdA* durch Komplementation

Die rekombinanten Plasmide wurden nach dem gleichen Verfahren wie unter Punkt 2.2 beschrieben konjugativ auf die beiden transposoninduzierten *tfdA*-Mutanten übertragen und direkt auf 2,4-D-Minimalmedium auf eine Komplementation der Mutationen getestet. Nach Inkubation für 10 bis 14 Tage zeigten sich Kolonien mit Wildtypwachstum in Transferversuchen mit denjenigen Plasmiden, welche ein von pJP4 stammendes, 3 kb großes *SacI*-Fragment aus pVJH21 enthielten, während alle übrigen *SacI*-Fragmente keine Komplementation hervorriefen. Die Plasmide pGJS31 und pGJS32, die das 3 kb *SacI*-Insert in verschiedenen Orientierungen enthielten (Abbildung 9), wurden anschließend unter quantifizierenden Bedingungen auf die Frequenz untersucht, mit der sie Komplementation hervorriefen. Kolonien mit Wildtypwachstum auf 2,4-D-Minimalmedium traten mit einer Häufigkeit von 3×10^{-7} bezogen auf den Rezipienten auf. Ob dieser niedrige Wert auf eine geringe Transferfrequenz zurückzuführen war, oder ob eventuell ein für die Komplementation zusätzlich nötiges Ereignis wie eine Mutation oder eine Rekombination von DNA-Fragmenten als Ursache dafür in Frage kam, konnte nicht geklärt werden, da aufgrund der hohen Spontanresistenzen der *A. eutrophus*-Stämme eine Transferrate für die plasmidkodierte Resistenzmarker nicht bestimmt werden konnte.

3.3. Expression der *tfdA*-Genfunktion in *Alcaligenes eutrophus* JMP222

Eine Komplementation von Mutationen durch klonierte DNA-Fragmente kann grundsätzlich über zwei Mechanismen erfolgen: Bei der Komplementation in trans bleibt das übertragene Plasmid als selbständiges Replikon im Rezipienten erhalten und synthetisiert ein Genprodukt, das die aufgrund der Mutation fehlende Funktion übernimmt; bei der Komplementation in cis wird das mutierte Gen durch Rekombination

mit einem nicht mutierten homologen DNA-Fragment in seiner ursprünglichen, funktionsfähigen Form wiederhergestellt. Da in letzterem Fall auch Bruchteile eines Gens zu einer Komplementation führen können, ist dieses System als Test zur Identifizierung und Charakterisierung eines intakten Strukturgens, wie sie für tfdA vorgesehen war, nur bedingt geeignet.

Deshalb sollte ein Testverfahren entwickelt werden, mit dem die Expression von tfdA ohne Umweg über eine Komplementation nachgewiesen werden konnte. Ein solcher Test war die Verwertung von Phenoxycyessigsäure (PAA) als Kohlenstoffquelle durch Stämme von A. eutrophus, welche ein kloniertes tfdA-Gen enthielten. Der Test beruht auf den folgenden zwei Eigenschaften der beiden Stämme A. eutrophus JMP134 und JMP222:

a) A. eutrophus JMP134 wie auch sein pJP4-freier Abkömmling JMP222 können Phenol als Wachstumssubstrat verwenden, da sie chromosomale Gene für eine meta-Spaltung von Phenol besitzen, die durch das Substrat induzierbar sind.

b) A. eutrophus JMP134 kann sehr leicht Mutanten bilden, die auf Phenoxycyessigsäure anstelle von 2,4-D wachsen können. Wie von Pieper (1986) nachgewiesen wurde, beruht diese Adaption auf der breiten Substratspezifität der 2,4-D-monooxygenase, die in einer zur 2,4-D-Seitenkettenspaltung analogen Reaktion auch Phenoxycyessigsäure zu Phenol umsetzen kann. Durch eine Änderung der Genregulation wird bei den sogenannten Paa⁺-Mutanten entweder Phenoxycyessigsäure als Induktor des 2,4-D-Abbaus erkannt, oder der gesamte 2,4-D-Abbau wird konstitutiv exprimiert. Der Metabolismus des PAA folgt nach der Abspaltung der Acetateinheit jedoch nicht dem auf pJP4 kodierten Weg der Hydroxylierung und ortho-Spaltung für chloresubstituierte Phenole. Das unsubstituierte Phenol wird vielmehr durch eine chromosomal kodierte Hydroxylierung und meta-Spaltung abgebaut, wodurch Phenoxycyessigsäure als Gan-

3.3.1. Untersuchung von Enzymaktivitäten für die Umsetzung von Phenol und Phenoxyessigsäure

Die Stämme A. eutrophus JMP134 (Wildtyp) und JMP134-Paa wurden mit verschiedenen Kohlenstoffquellen angezogen und mittels einer Sauerstoffelektrode auf die Verwertung von verschiedenen Substraten untersucht. Tabelle 10A zeigt, daß unsubstituiertes Phenol weder den plasmidkodierten Abbau von 2,4-Dichlorphenol zu induzieren vermag, noch von diesem als Substrat akzeptiert wird. Es wird stattdessen über einen eigenständigen, induzierbaren Weg metabolisiert. Aus Tabelle 10B wird ersichtlich, daß die 2,4-D-monooxygenase sowohl 2,4-D als auch PAA umsetzt, allerdings mit unterschiedlicher Aktivität. Beide Verbindungen fungieren im

Tabelle 10

Bestimmung der Substratverwertung lebender Zellen von A. eutrophus JMP134 und seiner Paa⁺ Mutante mit Hilfe der Sauerstoffelektrode. Die angegebenen relativen Aktivitäten beziehen sich auf eine Zellsuspension der OD(420nm) von 3 und geben die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in % von der Sättigungskonzentration (=100%) pro Minute an.

A.		Aktivität (% x min ⁻¹)		
Stamm	Medium	Phenol	2,4-DCP	2,4-D
JMP134(Wildtyp)	Pyruvat/3-CB	0	9.6	16.0
	Phenol	16.9	3.0	3.1
	Pyruvat	0	0.9	2.0
B.		Aktivität (% x min ⁻¹)		
Stamm	Medium	PAA	2,4-D	2,4-DCP
JMP134 Paa	2,4-D	10.0	27.6	19.3
	PAA	17.8	31.6	16.7
	Pyruvat	0.6	1.6	2.8

Fälle der Paa-Mutante außerdem als Induktoren der getesteten Enzyme, wobei die Induktion auch die 2,4-Dichlorphenol-Hydroxylase betrifft, obwohl diese für den weiteren Abbau von PAA nicht zur Verfügung steht.

3.3.2. Etablierung eines Phenoxyessigsäure metabolisierenden Weges in *A. eutrophus* JMP222

Nach den Erkenntnissen aus Punkt 3.3.1 sollte die Expression eines auf den rekombinanten Plasmiden pGJS31 und pGJS32 kodierten Gens tfdA in *A. eutrophus* JMP222 zusammen mit dessen induzierbaren, chromosomal kodierten Genen des Phenolabbaus zum Wachstum der rekombinanten Stämme auf Phenoxyessigsäure führen. Um das zu prüfen, wurden die Stämme *E. coli* S17-1, welche pGJS31 bzw. pGJS32 enthielten, mit *A. eutrophus* JMP222 gekreuzt. Transkonjuganten wurden parallel auf Fructose/Tc-Minimalagar und auf PAA-Minimalagar selektiert. Nach ca. 4 Tagen Inkubation zeigten sich Kolonien auf PAA-Medium und auf Fructose/Tc. Die konjugative Übertragung der PAA-Verwertung erfolgte mit der gleichen Häufigkeit wie die Übertragung des plasmidkodierten Resistenzmarkers (5×10^{-2} pro Rezipient), wobei der Stamm JMP222 als Kontrolle keine Kolonien auf PAA ($<10^{-9}$ pro Rezipient) bildete, jedoch mit geringer Frequenz spontane Tc-Resistenzen (10^{-6} pro Rezipient) aufwies. Alle auf PAA gewachsenen Stämme waren außerdem gegen Tc und Cm resistent, was den gemeinsamen Transfer der plasmidkodierten Resistenzmarker mit dem Gen tfdA bestätigte.

Während *A. eutrophus* auf Minimalmedien im allgemeinen weiße Kolonien ausbildete, zeichneten sich die auf PAA gewachsenen Kolonien durch eine leichte Gelbfärbung aus. Sie war ein Hinweis dafür, daß in den PAA-abbauenden Stämmen die Enzyme für die meta-Spaltung von Aromaten aktiv waren, denn das unmittelbare Produkt der Ringspaltungsreaktion, der 2-Hy-

droxymuconsäure-semialdehyd, weist eine intensive Gelbfärbung auf. Man konnte die Färbung noch verstärken, indem man die Agarplatte mit den darauf gewachsenen Kolonien mit einer konzentrierten Brenzcatechinelösung (0.5 M) besprühte. Dieser Test wird gewöhnlich zum in vivo-Nachweis eines induzierten Weges der aromatischen meta-Spaltung angewandt. Nach einer kurzen Inkubation von 1 bis 3 h zeigte sich eine intensive Gelb- bis Braunfärbung bei den PAA-verwertenden Stämmen, während Kontrollstämmen auf Fructose-Medium farblos blieben.

3.4. Umklonierung des *tfdA*-Fragments in den Vektor pKT231

Das 3 kb große *SacI*-Fragment mit dem Gen *tfdA* wurde aus dem Plasmid pGJS31, das auf dem Vektor pGSS33 basierte, in den ebenfalls zur IncQ-Gruppe gehörenden Vektor mit breitem Wirtsbereich pKT231 (Abbildung 8) umkloniert. Die rekombinanten Plasmide pKJS31 und pKJS32 wurden zunächst anhand ihres in *E. coli* LE392 exprimierten Km-resistenten und Sm-sensitiven Phänotyps identifiziert, durch Restriktionskartierung charakterisiert (Abbildung 10) und anschließend durch Transformation in den mobilisierenden Stamm S17-1 überführt. Die Umklonierung des *tfdA*-Fragments wurde aus den folgenden zwei Gründen vorgenommen: Zum Einen bot die Verwendung der beiden Vektoren pGSS33 und pKT231 aufgrund deren unterschiedlicher Restriktionskarten zusätzliche Möglichkeiten, aus dem klonierten Insert mit Restriktionsenzymen gezielt DNA-Fragmente herauszuschneiden, um damit das *tfdA* tragende Fragment auf die kleinstmögliche Länge zu verkürzen. Zum Anderen war die von pKT231 in den transkonjuganten Stämmen von *A. eutrophus* JMP222 exprimierte Km-Resistenz wesentlich besser nachzuweisen, da spontane Resistenzentwicklung, wie sie bei Tc beobachtet wurde (vgl. Punkt 3.2), bei Km nicht auftrat. Damit war es möglich, bei der Verwendung der PAA-Verwertung als Testsystem für *tfdA*, auf die quantitative Auswertung von Transferversuchen zu verzichten. Die Konjugationsmischung aus Donor- und Rezipientenzellen wurde einfach mit einem sterilen Zahnstocher

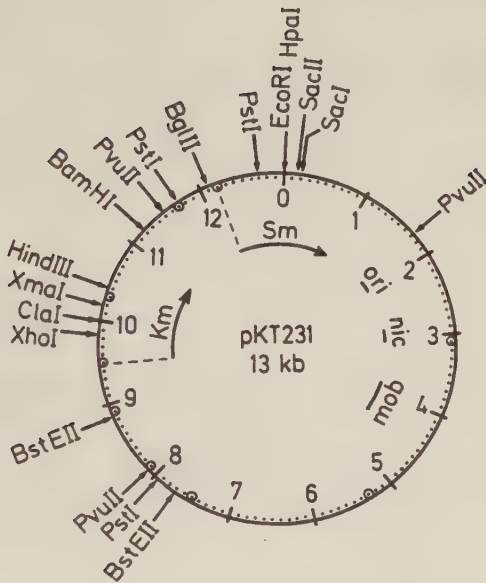


Abbildung 8

Restriktionskarte des broad-host-range Vektor-Plasmids pKT231 (nach K. N. Timmis, persönl. Mitteilung). Die auf dem Vektor vorhandenen Promotoren sind durch kleine Kreise gekennzeichnet.

Tabelle 11 Anzahl der Restriktions-schnittstellen in pGJS31 und pGJS32 (Abbildung 9).

Enzym	Schnittstellen	
	im Vektor	im Insert
BamHI	1	1
BclI	-	-
BglII	-	2
BstEII	1	-
ClaI	1	-
EcoRI	1	1
HindIII	1	-
HpaI	-	-
KpnI	-	-
PstI	1	-
PvuI	1	-
SalI	1	1
SphI	-	3
XbaI	-	1
XhoI	-	2
XmaI	-	2

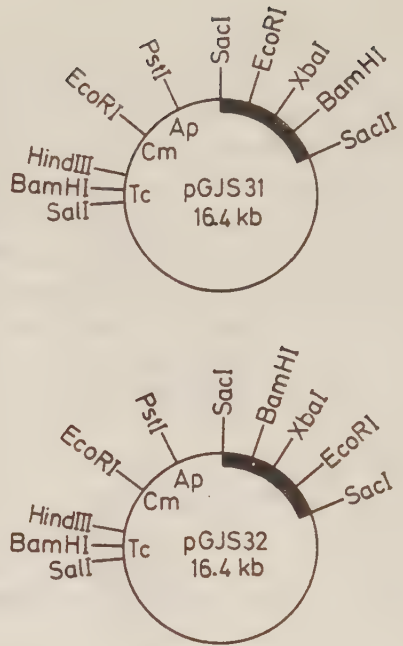


Abbildung 9

Hybride Plasmide auf der Basis des broad-host-range Vektors pGSS33. Die Plasmide pGJS31 und pGJS32 enthalten das Gen *tfdA* auf einem 3 kb *SacI*-Fragment aus pJP4. Sie sind in der Lage, transposoninduzierte *tfdA*-Mutationen zu komplementieren, sowie in *A. eutrophus* JMP222 die Fähigkeit zum Abbau von Phenoxyessigsäure zu exprimieren.

parallel auf 2,4-D enthaltende und auf Fructose/Km enthaltende Minimalagar-Platten ausgestrichen. Nach 3 Tagen Inkubation konnte der erfolgte Plasmidtransfer anhand der Km-Resistenz, die Expression von *tfdA* anhand des Wachstums auf Phenoxyessigsäure nachgewiesen werden. Stämme mit den Plasmiden pKJS31 und pKJS32 zeigten sogar rapideres Wachstum auf PAA als solche mit pGJS31 und pGJS32, was vermutlich auf die Anwesenheit mehrerer Promotoren auf dem Vektor pKT231 (Abbildung 8) zurückzuführen war.

3.5. Charakterisierung der rekombinanten Plasmide

Für die Plasmide pGJS31 und pGJS32 wurden durch Restriktionsanalyse die Erkennungsstellen für mehrere Endonukleasen ermittelt (Abbildung 9). Tabelle 11 zeigt die getesteten Enzyme und die Anzahl der dazugehörigen Schnittstellen im Vektor pGSS33 und im 3 kb großen SacI-Insert. In Abbildung 10 sind die Restriktionskarten der Plasmide pKJS31 und pKJS32 dargestellt, die das 3 kb SacI-Insert in beiden Orientierungen enthalten.

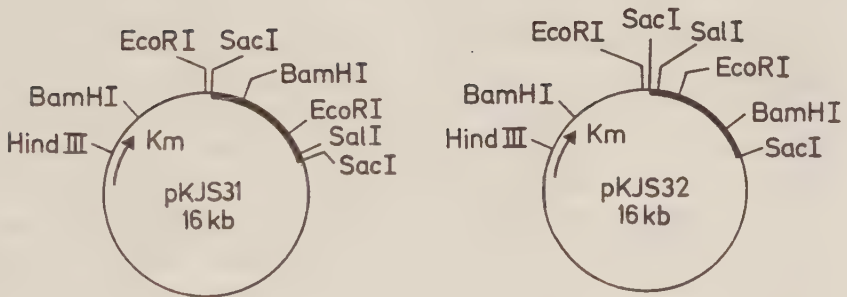


Abbildung 10

Hybride broad-host-range Plasmide auf der Basis von pKT231 mit dem Gen *tfdA* auf einem 3 kb *SacI*-Fragment aus pJP4. Die Plasmide exprimieren in *A. eutrophus* JMP222 die Fähigkeit zum Abbau von Phenoxyessigsäure und in *Pseudomonas* B13 die Verwertung von 4-Chlorphenoxyessigsäure.

4. Expression der tfdA-Genfunktion in Pseudomonas B13

Der Pseudomonas-Stamm B13 wurde als 3-CB abbauender Organismus isoliert (Dorn et al. 1974), und wurde in weiteren Versuchen an die Verwertung von 4-Chlorphenol (4-CP) adaptiert (Schwien und Schmidt. 1982). Beim Abbau von 3-CB und 4-CP bedient sich B13 ähnlich wie der ebenfalls 3-CB abbauende Stamm A. eutrophus JMP134 eines ortho-Spaltungsweges für chlorierte Catechole. Im Gegensatz zu JMP134 kann B13 jedoch keine Phenoxycarbonsäuren verwerten. Da die 2,4-D-monooxygenase aus JMP134 nicht nur 2,4-D und Phenoxycarbonsäure als Substrate akzeptiert (Punkt 3.3.1, Tabelle 10), sondern auch deren monosubstituiertes Derivat 4-Chlorphenoxycarbonsäure (4-CPA) zu dem korrespondierenden Phenol 4-CP umsetzt (Pieper 1986), sollte es somit möglich sein, durch Einführung des Gens tfdA und Expression der 2,4-D-monooxygenase in Pseudomonas B13 einen Abbauweg für 4-CPA zu etablieren.

Zur Expression des Gens tfdA in Pseudomonas B13 wurden die Plasmide pKJS31 und pKJS32 in der schon für A. eutrophus JMP222 beschriebenen Weise konjugativ auf den Stamm B13 übertragen. Wie erwartet waren Transkonjuganten in der Lage, auf 4-CPA-Minimalmedium Kolonien zu bilden. Zusätzlich konnten sie aber auch noch auf Phenoxycarbonsäure wachsen, was mit der bisherigen Erkenntnis im Widerspruch steht, daß B13 Phenol nicht als C-Quelle verwerten kann (Schwien und Schmidt. 1982). In Abbildung 11 sind die Reaktionen zusammengefaßt, die mit Hilfe der 2,4-D-monooxygenase in Transkonjuganten von A. eutrophus JMP222 den Abbau von PAA und in Transkonjuganten von Pseudomonas B13 den Abbau von 4-CPA bewirken.

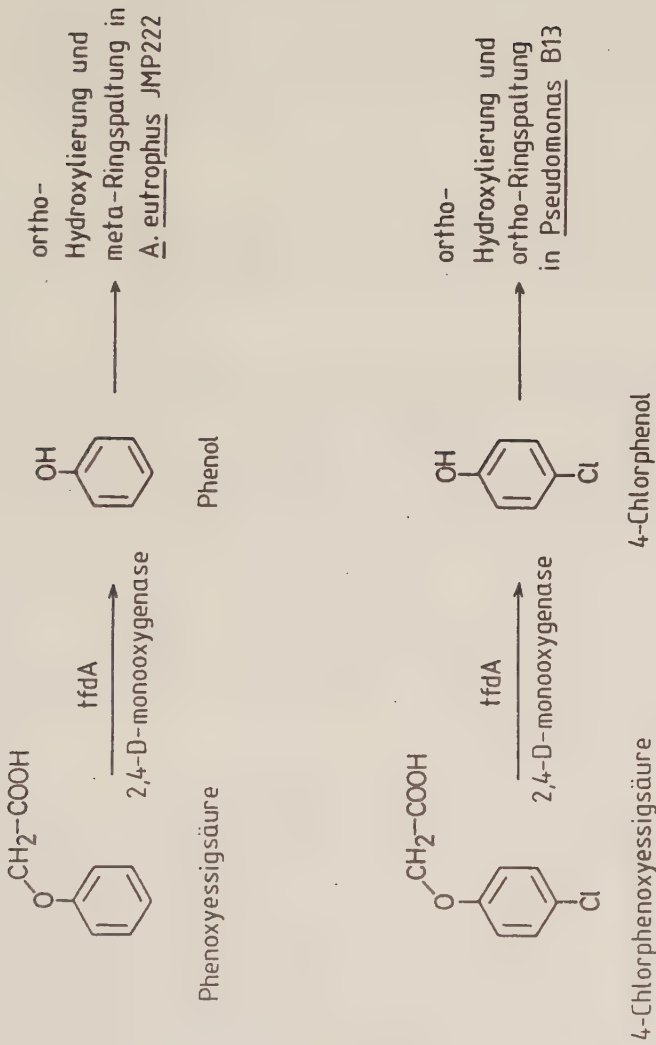


Abbildung 11 Expression des klonierten tfdA-Gens in Alcaligenes und Pseudomonas. Dem Stamm A. eutrophus JMP222 verleiht tfdA die Fähigkeit, auf Phenoxyessigsäure zu wachsen. Dem Stamm Pseudomonas B13 ermöglicht tfdA die Verwertung von 4-Chlorphenoxyessigsäure.

5. Charakterisierung von *tfdA* durch Deletion, Subklonieren und Insertion von DNA-Fragmenten

Im Folgenden wurde versucht, die Lage des die 2,4-D-monooxygenase kodierenden Strukturgens (*tfdA*) auf dem 3 kb *SacI*-Fragment genauer zu definieren, indem durch Entfernen verschiedener DNA-Abschnitte das kleinstmögliche noch aktive Fragment ermittelt wurde. Ausgehend von den vier Plasmiden pGJS31, pGJS32, pKJS31 und pKJS32 wurden dazu folgende Verfahren angewandt:

- a) Deletion definierter DNA-Fragmente aus den Plasmiden,
- b) Umklonieren kleinerer Subfragmente in andere Vektoren,
- c) Insertion fremder DNA-Fragmente in die Plasmide.

Die neu konstruierten Plasmide wurden durch Transformation in den mobilisierenden Stamm *E. coli* S17-1 überführt und anschließend durch Konjugation auf *A. eutrophus* JMP222 übertragen. Die Expression des PAA-Abbaus in diesem Stamm fungierte schließlich als Test auf das Vorhandensein eines intakten *tfdA*-Gens auf den rekombinanten Plasmiden.

5.1. Konstruktion der Plasmide mit breitem Wirtsbereich

5.1.1. Einführung von Deletionen

Bei einfachen Deletionen wurden aus den Plasmiden DNA-Fragmente zwischen einer Restriktionsschnittstelle auf dem Insert und einer Schnittstelle auf dem Vektor herausgeschnitten. Die beiden linearen Bruchstücke wurden religiert, wobei das kleinere Bruchstück verlorenging. Die Schnittstellen wurden so gewählt, daß der beabsichtigte Verlust des DNA-Fragments nicht zum Verlust wichtiger plasmideigener Resistenz-, Replikations- oder Transferfunktionen führte.

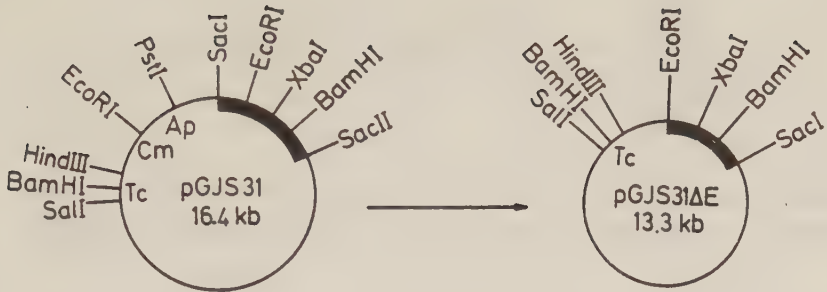


Abbildung 12 Deletion des EcoRI-Fragments aus dem Plasmid pGJS31. Die Deletion führte zum Verlust der Expression von tfdA.

Das Plasmid pGJS31ΔE entstand durch Entfernen des kleinen EcoRI-Fragments aus pGJS31 (Abbildung 12). In analoger Weise entstanden das Plasmid pKJS32ΔE durch Deletion eines EcoRI-Fragments aus pKJS32, und das Plasmid pKJSB330 durch Deletion eines BamHI-Fragments aus pKJS31. Zur Konstruktion des Plasmids pKJS(X)630 wurde pKJSB330 mit den beiden Enzymen XbaI und BamHI geschnitten. Da das daraus entstandene lineare Plasmid keine komplementär überlappenden Enden aufwies, mußten die überstehenden DNA-Enden zunächst mit DNA-Polymerase I zu glatten Enden (blunt end) aufgefüllt werden, die dann ligiert werden konnten.

Für eine Deletion ausgehend von der SalI-Schnittstelle auf dem 3 kb SacI-Insert von pKJS32 stand keine zweite Schnittstelle auf dem Vektoranteil zur Verfügung. Sowohl für BamHI als auch für BglII war noch mindestens je eine weitere Schnittstelle auf dem Insert vorhanden, durch eine Restriktion mit HindIII wäre dagegen die plasmidkodierte Km-Resistenz inaktiviert worden. Aus diesem Grund wurde pKJS32 zwar mit SalI und HindIII geschnitten, das fehlende Bruchstück wurde jedoch durch ein homologes SalI/HindIII-Fragment aus dem Plasmid pRME1 (Abbildung 13) ersetzt.

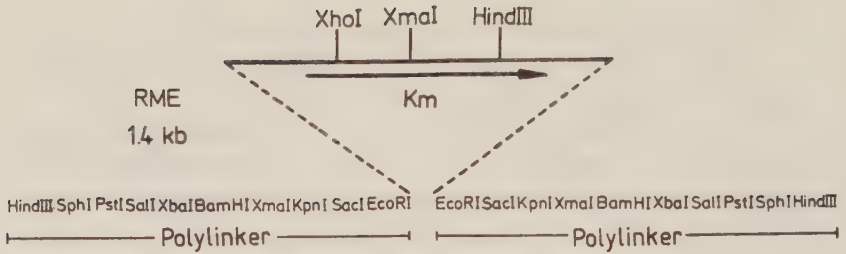


Abbildung 13 Restriktionskarte des RME-Fragments aus dem Plasmid pRME1.

Dadurch wurde das Km-Resistenzgen in seiner Funktionsfähigkeit wiederhergestellt und rekombinante Klone konnten auf Km selektiert werden. Das Plasmid pKJS32RH Δ S' (Abbildung 14) enthält somit zusätzlich eine Reihe weiterer Restriktionsstellen in Nachbarschaft zur SalI-Stelle, die aus dem Polylinker von pRME1 stammen (vgl. Punkt 5.1.3).

5.1.2. Subklonieren kleinerer Fragmente

Zur Konstruktion von pKJE Δ B130 (Abbildung 14) wurde das 1.5 kb EcoRI/BamHI-Fragment aus dem SacI-Insert von pKJS32 in den mit EcoRI und BamHI geschnittenen Vektor pKT231 kloniert. Transformanten von LE392 wurden auf Sm-Agar selektiert und rekombinante Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert.

Ein weiteres Plasmid entstand durch Herausschneiden des kleineren HindIII/BglII-Fragments aus pKJSB330 und Einsetzen in den mit HindIII und BglII geschnittenen Vektor pKT231. Das Plasmid pKJBB'230 enthielt somit ein 1.5 kb BglII/BamHI-Subfragment des ursprünglich von pJP4 stammenden

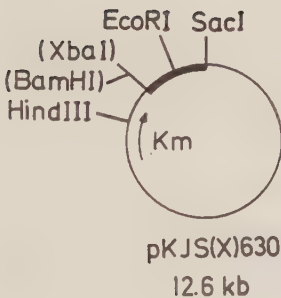
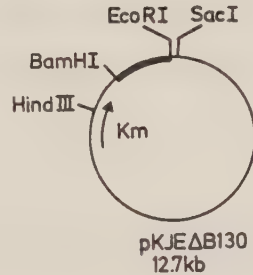
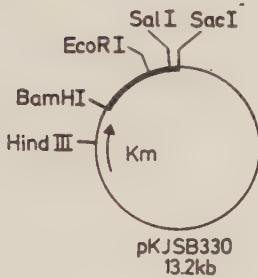
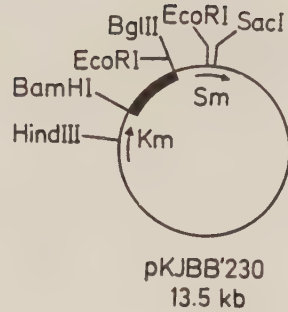
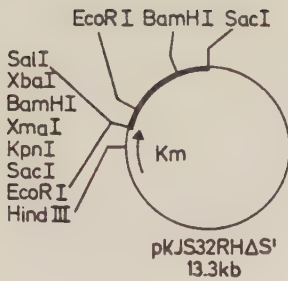


Abbildung 14

Hybride broad-host-range Plasmide auf der Basis von pKT231. Das von pJP4 stammende 3 kb SacI-Fragment wurde ausgehend von den *tfdA* exprimierenden Plasmiden pKJS31 und pKJS32 von beiden Enden her durch Deletion und Subklonieren verkleinert. Die Plasmide auf der linken Seite exprimierten in *A. eutrophus* JMP222 die Fähigkeit zur Spaltung von Phenoxyessigsäure, während die Plasmide auf der rechten Seite inaktiv waren.

Inserts. Um eine aufwendige Trennung der Restriktionsfragmente vor der Ligation zu vermeiden, wurde pKJSB330 nicht nur mit HindIII und BglII, sondern zusätzlich mit PstI geschnitten, so daß eine Vielzahl von Plasmidbruchstücken entstand, die nicht mehr zum Ausgangsprodukt religieren konnten. Durch Selektion auf Km wurden dann diejenigen rekombinanten Plasmide erhalten, bei denen das zunächst zerteilte Km-Resistenzgen von pKT231 wie bei pKJS32RHΔS' durch das neu eingesetzte DNA-Fragment aus pKJSB330 rekonstituiert worden war.

5.1.3. Insertion fremder DNA-Fragmente

Eine weitere Möglichkeit, durch in vitro-Veränderungen rekombinanter Plasmide das Gen tfdA zu lokalisieren, bestand darin, ein fremdes DNA-Segment in eine definierte Restriktionsschnittstelle einzusetzen, um damit tfdA zu inaktivieren. Das Segment RME aus dem Plasmid pRME1 war von W. Messer (persönl. Mitteilung) speziell für die Insertion in verschiedene Restriktionsstellen konstruiert worden. Es enthält ein Km-Resistenzgen und wird von zwei invertierten DNA-Sequenzen flankiert, welche multiple Restriktionsstellen tragen (RME = restriction site mobilizing element, Abbildung 13). Durch den Resistenzmarker können die Insertions-Derivate einfach selektiert werden.

Zur Insertion des RME-Fragmentes wurde das Plasmid pGJS31 durch Restriktion an der einzigen XbaI-Stelle linearisiert, welche inmitten des 3 kb SacI-Inserts gelegen war. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend mit einem ebenfalls XbaI-geschnittenen pRME1 ligiert und Transformanten von E. coli S17-1 wurden auf Km- und Tc-Resistenz selektiert. Die rekombinanten Plasmide pGJS31RX1 und pGJS31RX2, welche das Km-Resistenzgen in unterschiedlicher Orientierung enthielten, wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert (Abbildung 15).

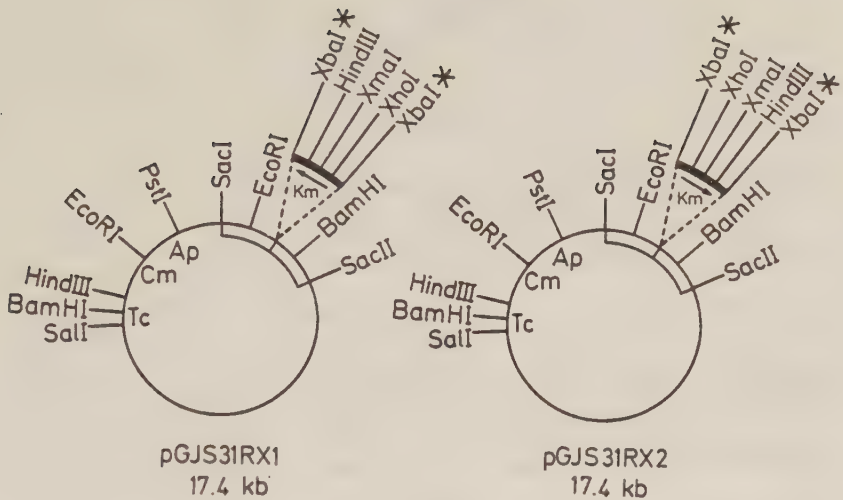


Abbildung 15

Insertion des 1.4 kb RME-Fragments an der XbaI-Stelle des broad-host-range Plasmids pGJS31. Die mit * gekennzeichneten Restriktionsstellen sind Bestandteil des RME-Polylinkers EcoRI-SacI-KpnI-XmaI-BamHI-XbaI.

5.2. Einfluß von Deletionen und Insertionen auf die Expression des Gens *tf_{dA}*

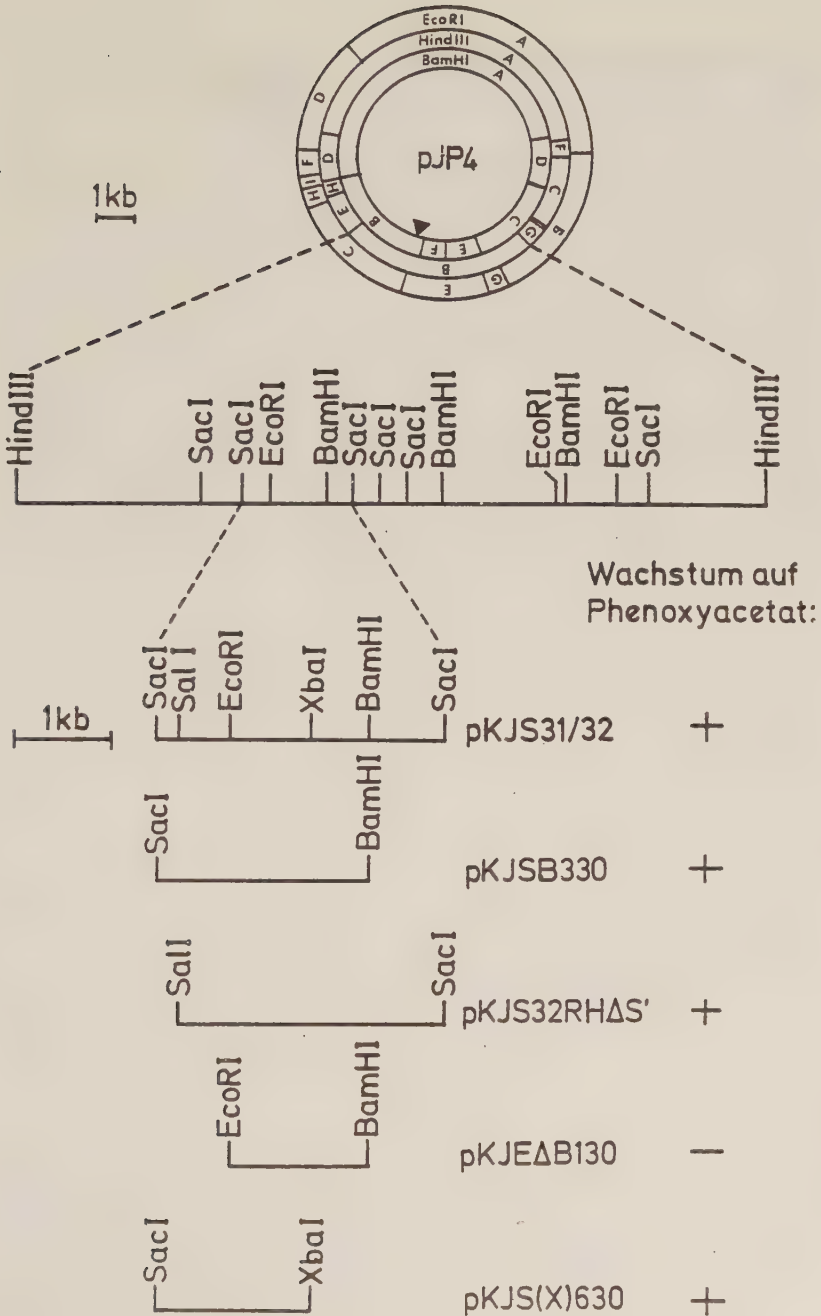
Alle unter Punkt 5.1. beschriebenen rekombinanten Plasmide wurden aus *E. coli* S17-1 konjugativ in *A. eutrophus* JMP222 übertragen. Durch Überprüfung der plasmidkodierten Resistenzmarker wurde kontrolliert, ob der Transfer der Plasmide tatsächlich stattgefunden hatte. Die Expression von *tf_{dA}* wurde anschließend anhand des Wachstums der Transkonjuganten auf Phenoxyyessigsäure überprüft. Die Ergebnisse der Wachstumstests sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Abbildung 16 zeigt die Herkunft der wichtigsten in pKT231 klonierten Fragmente, ausgehend von einer Restriktionskarte des Plasmids pJP4.

Tabelle 12 Expression des Gens tfdA von broad-host-range Plasmiden in A. eutrophus JMP222.

Plasmid	Insert	Wachstum auf Phenoxyessigsäure
pGJS31/32	SacI _____ SacI	+++
pKJS31/32	SacI _____ SacI	+++
pKJSB330	SacI _____ BamHI	+++
pKJS(X)630	SacI _____ (XbaI)	+++
pKJS32RHAS'	SalI _____ SacI	+++
pGJS31RX1	SacI  SacI	+++
pGJS31RX2	SacI  SacI	+/-
pGJS31ΔE	EcoRI _____ SacI	-
pKJS32ΔE	EcoRI _____ SacI	-
pKJEΔB130	EcoRI _____ BamHI	-
pKJBB'230	BglII _____ BamHI	-

Abbildung 16

Herkunft der in pKT231 klonierten Fragmente des Wildtyp-Plasmids pJP4. Ausgehend vom 21 kb HindIII-Fragment aus pJP4 wurde das Gen tfdA auf einem 3 kb SacI-Fragment kloniert. Durch Testen verschiedener Subfragmente auf die Expression des Phenoxyessigsäure-Abbaus in A. eutrophus JMP222 konnte das Gen auf dem Bereich zwischen der XbaI- und der SalI-Stelle lokalisiert werden. Der Pfeil bezeichnet die Lage von tfdA im Plasmid pJP4.



Aus den Expressionsversuchen in A. eutrophus JMP222 ging hervor, daß die Aktivität der Seitenkettenspaltung auf einem zwischen der SalI- und der XbaI-Stelle gelegenen 1.4 kb großen DNA-Fragment kodiert sein mußte. Zusätzlich wurde beobachtet, daß im Falle der Insertion von RME in die XbaI-Stelle von pGJS31, die Aktivität nur bei einer der beiden möglichen Orientierungen des eingebauten Km-Resistenzgens voll exprimiert wurde. Bei dieser Orientierung konnte das XbaI/SalI-Fragment theoretisch vom Promotor des Km-Resistenzgens her transkribiert werden. Diese Beobachtung ließ bereits vermuten, daß a) die Transkription des Gens tfdA von XbaI nach SalI verlief, und daß b) durch die Insertion an der XbaI-Stelle bereits Promotorstrukturen von tfdA beeinflußt wurden, so daß die Hilfe eines fremden Promotors für die Expression von tfdA notwendig wurde.

6. Identifizierung des Genproduktes und der Transkriptionsrichtung von tfdA

Eine gebräuchliche Methode zur Identifizierung plasmidkodierter Proteine ist das Minizellsystem, wobei Gene von Plasmiden mit hoher Kopienzahl in chromosom-freien Zellen, den Minizellen, exprimiert und radioaktiv markiert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Expressionsvektoren, bei denen die Transkription nicht wie beim Minizellsystem von den geneigenen Promotoren, sondern von einem fremden Promotor ausgeht. Eine solches Expressionsverfahren, das sich durch eine besonders einfache Handhabung auszeichnete, stand mit dem von Tabor und Richardson (1985) entwickelten T7-RNA-Polymerase / Promotor-System zur Verfügung. Man benötigt dazu zwei miteinander kompatible Plasmide, deren Aufbau in Abbildung 17 dargestellt ist:

a) Das Plasmid pGP1-2 kodiert eine Km-Resistenz, es enthält ferner das Gen für den hitzesensitiven lambda-Repressor cI857 unter der Kontrolle des lac-Promotors und das Gen für die T7-RNA-Polymerase (T7-Gen1) unter der Kontrolle des induzierbaren lambda-Promotors P_L .

b) Das pT7-Vektorplasmid kodiert eine Ap-Resistenz und enthält den T7-RNA-Polymerase-Promotor $\phi 10$ gefolgt von einer DNA-Sequenz mit multiplen Restriktionsstellen (Polylinker) zur Insertion von DNA-Fragmenten. Die beiden von Tabor konstruierten Vektoren pT7-5 und pT7-6 (Abbildung 18) unterscheiden sich in der Orientierung des Polylinkers zur Transkriptionsrichtung des T7-Promotors.

Um ein gegebenes Gen zu exprimieren, wird das betreffende DNA-Fragment in eines der pT7-Vektoren inseriert. In E. coli-Zellen, die zusätzlich zu dem rekombinanten pT7-Plasmid das Plasmid pGP1-2 enthalten, führt die Hitzeinduktion der

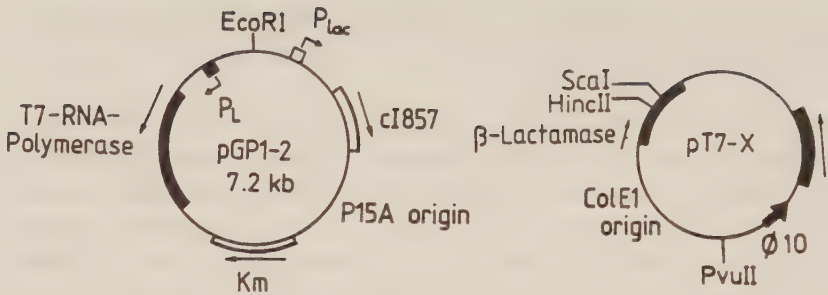


Abbildung 17

Gekoppeltes T7-RNA-Polymerase/Promotor-System (nach Tabor und Richardson 1985). Zellen enthalten pGP1-2 mit dem Gen für die T7-RNA-Polymerase (links), und eines der pT7-Plasmide mit einem DNA-Insert im Anschluß an den T7-Promotor Ø10 (rechts). Bei 30°C blockiert der hitzesensitive lambda-Repressor (cI857) die Transkription der T7-RNA-Polymerase auf dem Plasmid pGP1-2, durch Temperaturerhöhung auf 42°C wird die T7-RNA-Polymerase exprimiert, die dann ihrerseits das Plasmid pT7-X vom T7-Promotor her mit hoher Effizienz transkribiert.

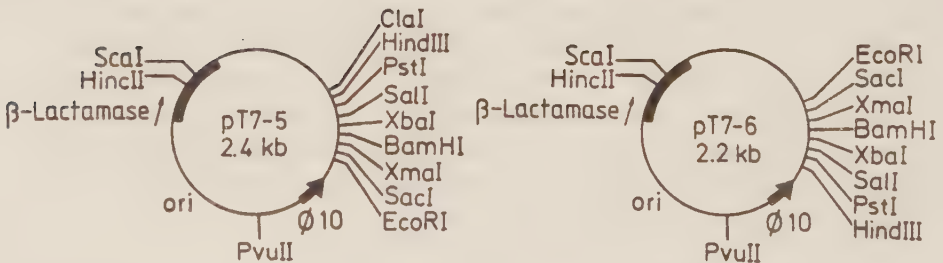


Abbildung 18

T7-RNA-Polymerase/Promotor-Vektoren zur spezifischen Expression klonierter Gene. Die Plasmide enthalten einen Polylinker im Anschluß an den T7-Promotor Ø10 und das Gen für die β-Lactamase in entgegengesetzter Richtung zum Promotor: Die Expression durch die T7-RNA-Polymerase beschränkt sich ausschließlich auf die klonierten Gene.

T7-RNA-Polymerase zur Transkription des klonierten Gens, nicht jedoch der β -Lactamase, die entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung orientiert ist. Eine ausschließliche Expression des auf dem Insert kodierten Gens wird dadurch erreicht, daß man die E. coli-RNA-Polymerase mit Rifampicin hemmt und somit die Expression zellulärer Gene unterdrückt. Die plasmidkodierten Proteine können dann durch Zusatz von L-(³⁵S)Methionin spezifisch markiert werden.

6.1. Konstruktion von Plasmiden mit induzierbarer Expression

Drei verschieden große Subfragmente des 3 kb großen SacI-Fragments sollten auf die Expression von Genen mit Hilfe des T7-Promotors untersucht werden:

- a) das SacI/SalI-Fragment (2.8 kb),
- b) das BamHI/SalI-Fragment (2.06 kb),
- c) das XbaI/SalI-Fragment (1.4 kb).

Dazu wurde zunächst ein SacI/SalI-Restriktionsverdau von pKJS32 mit den beiden T7-Vektoren pT7-5 und pT7-6 (Abbildung 18) ligiert. E. coli LE392 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert und Ap-resistente Transformanten wurden durch Restriktion analysiert. Die rekombinanten Plasmide pTJSS'035 (aus pT7-5) und pTJSS'036 (aus pT7-6) enthielten das 2.8 kb SacI/SalI-Insert in den beiden möglichen Orientierungen zum T7-Promotor.

Das 2 kb BamHI/SalI-Fragment wurde mittels DEAE-Membran aus einem elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsverdau von pKJSB330 isoliert und in die genannten T7-Vektoren kloniert, woraus sich die Plasmide pTJS'B435 (aus pT7-5) und pTJS'B436 (aus pT7-6) ergaben.

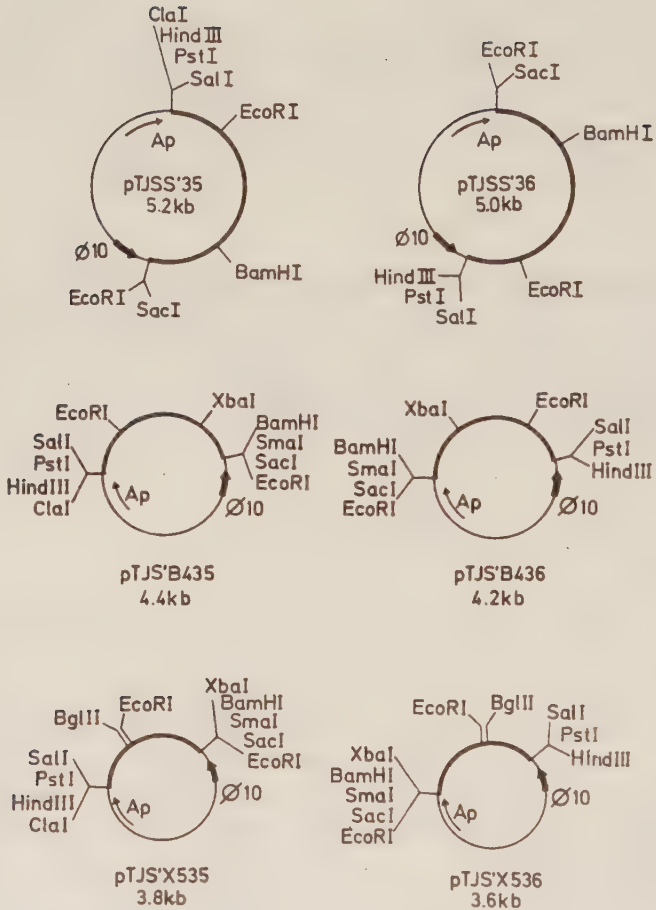


Abbildung 19

Rekombinante Plasmide auf der Basis der T7-Promotor-Vektoren pT7-5 und pT7-6 mit dem klonierten Gen *tfdA*. Die dargestellten Plasmide unterscheiden sich durch die Länge der Inserts, sowie durch ihre Orientierung zum T7-Promotor. Bei den Inserts handelt es sich um Subfragmente des von pJP4 stammenden 3 kb *SacI*-Fragments. In den Plasmiden pTJSS'35, pTJS'B435 und pTJS'X535, die das Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors exprimieren, verläuft die Ø10-abhängige Transkription von der XbaI- zur SalI-Stelle.

Zur Klonierung des 1.4 kb XbaI/SalI-Fragments wurde das Plasmid pTJSS'035 mit XbaI, SalI und BamHI verdaut und anschließend mit den mit XbaI und SalI geschnittenen T7-Vektoren ligiert. Der zusätzliche Verdau mit BamHI diente dabei der Verhinderung einer Religation des ursprünglichen Plasmids pTJSS'035. Die daraus gebildeten rekombinanten T7-Plasmide waren pTJS'X535 (aus pT7-5) und pTJS'X536 (pT7-6).

Die Restriktionskarten der genannten rekombinanten pT7-Plasmide sind in Abbildung 19 dargestellt.

6.2. Spezifische Markierung des von tfdA kodierten Proteins

Die unter Punkt 6.1. beschriebenen rekombinanten T7-Plasmide wurden durch Transformation in E. coli K38 überführt, der bereits das Plasmid pGP1-2 enthielt. Die Transformanten wurden gleichzeitig auf Ap und Km selektiert, so daß sie sowohl eines der pT7-Derivate, als auch das Plasmid pGP1-2 nebeneinander in der Zelle enthielten. Diese Stämme wurden dann unter Selektionsdruck angezogen und durch Hitzeinduktion zur Überproduktion der plasmidkodierten Genprodukte angeregt, wobei die Expression zelleigener Gene mit Rifampicin gehemmt wurde. Die Proteine wurden durch Zusatz von L-(³⁵S)Methionin in vivo radioaktiv markiert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Autoradiographie der Gele zeigte, daß jeweils ein einzelnes, spezifisch radioaktiv markiertes Protein von denjenigen Plasmiden exprimiert wurde, bei denen die T7-RNA-Polymerase das klonierte Fragment von der XbaI- zur SalI-Restriktionsstelle transkribierte. Bei den in der entgegengesetzten Richtung transkribierten Konstrukten sowie den insertfreien Vektorplasmiden war keine spezifisch induzierbare Genexpression zu beobachten (Abbildung 20). Durch

Vergleich mit mehreren Standardproteinen wurde für das identifizierte Protein ein Molekulargewicht von 32.000 ermittelt. Da die Transkriptionsrichtung des β -Lactamasegens in allen Plasmiden der des T7-Promotors entgegengesetzt war, konnte es sich bei dem markierten Protein nur um das Genprodukt von tfdA handeln. Dabei stimmte die Lokalisation des Gens auf dem 1.4 kb XbaI/SalI-Fragment und seine Transkriptionsrichtung vom XbaI- zum SalI-Ende mit den unter Punkt 5 beschriebenen Ergebnissen überein.

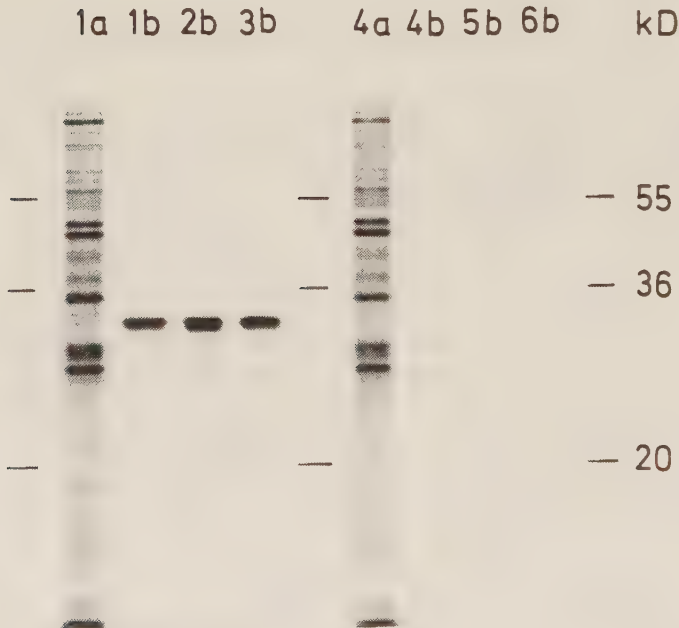


Abbildung 20

Expression von tfdA durch T7-RNA-Polymerase. Zellen von *E. coli* K38 enthielten pGP1-2⁻ und eines der folgenden rekombinanten pT7-Plasmide: pTJSS'035 (1), pTJS'B435 (2), pTJS'X535 (3), pTJSS'036 (4), pTJS'B436 (5) pTJS'X536 (6). Zellprotein wurde (a) ohne Induktion des Systems und (b) nach Hitzeinduktion und Rifampicinzugabe radioaktiv markiert, über ein 12.5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

7. Nachweis der tfdA-Genfunktion durch einen in vivo-Enzymtest

Amy et al. (1985) konnten eine Expression der 2,4-D-Seitenkettenspaltung in E. coli nachweisen. Als in vivo-Enzymtest nutzten sie die Freisetzung von radioaktivem CO_2 aus 2,4-D, das in Position 2 der Acetateinheit mit ^{14}C markiert war (Abbildung 21). Ein Zusatz von Calciumchlorid im Ansatz bewirkte dabei, daß die Zellwände für das Substrat durchlässig wurden.

Mit dieser Methode sollte nun auch im Falle des überexprimierten tfdA-Genprodukts der Nachweis für dessen 2,4-D-spaltende Aktivität erbracht werden. Dazu wurden Flüssigkulturen von E. coli K38, die nebeneinander pGP1-2 und eines der rekombinanten pT7-Plasmide enthielten, durch Hitzeinduktion und Rifampicinzusatz zur spezifischen Überproduktion plasmidkodierter Proteine veranlaßt. Die Zellen wurden anschließend nach der Methode von Amy et al. (1985) mit

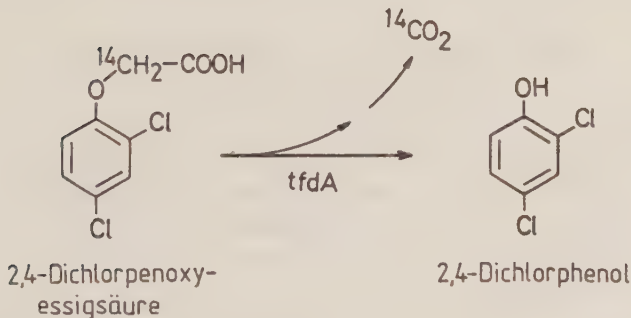


Abbildung 21 Bestimmung der von tfdA in E. coli exprimierten 2,4-D-monooxygenase im in vivo-Enzymtest.

radioaktivem 2,4-D inkubiert. Als Maß für die Aktivität der 2,4-D-monooxygenase wurde dann die Radioaktivität des freigesetzten CO_2 bestimmt, die aus der Gasphase in alkalischem Milieu absorbiert und im Szintillationszähler gemessen wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 13 dargestellt.

Im Vergleich zu den insertfreien Vektoren pT7-5 und pT7-6 zeigten die Plasmide mit dem klonierten XbaI/Sal-Insert (pTJS'X535 und pTJS'X536) eine deutliche Aktivität in der 2,4-D-Seitenkettenspaltung. Der Unterschied zwischen den beiden Plasmiden mit unterschiedlichen Orientierungen des Inserts war dabei geringer als erwartet. Möglicherweise war ein Promotor des tfdA-Gens oder der Promotor des β -Lactamasegens bereits während der Anzucht der Zellen stark genug, daß das entgegengesetzt zum T7-Promotor gerichtete Gen bereits 75% der Aktivität des induzierten Gens exprimierte.

Eine Zeitabhängigkeit der Freisetzung von radioaktivem CO_2 sollte nun zeigen, ob sich die Überexpression des tfdA-Gens auch in einer hohen Aktivität im in vivo-Enzymtest widerspiegelte. Dazu wurde die Inkubation nach 0, 1, 2, 4 und 16h

Tabelle 13 Nachweis der Seitenkettenspaltung von 2,4-D durch das klonierte 1.4 kb Fragment aus pJP4 in E. coli K38.

Plasmide	freigesetzte Menge $^{14}\text{CO}_2$ aus	
	0.1 μCi	0.2 μCi
pGP1-2/pT7-5	0.3 kcpm	1.3 kcpm
pGP1-2/pTJS'X535	69 kcpm	130 kcpm
pGP1-2/pT7-6	n.b.	1.0 kcpm
pGP1-2/pTJS'X536	n.b.	98 kcpm

n.b. = nicht bestimmt

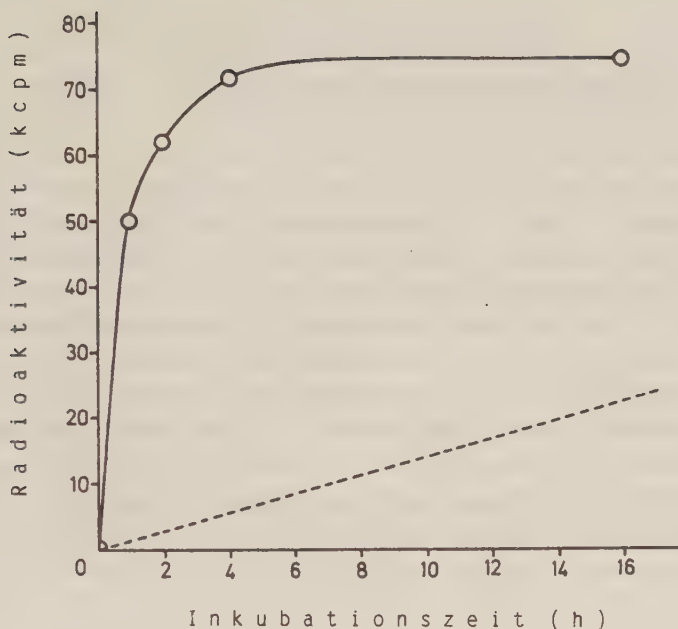


Abbildung 22

Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus radioaktiv markiertem 2,4-D durch die 2,4-D-monooxygenase in *E. coli* K38 pGP1-2/pTJS'X535. Zum Vergleich ist die von Amy et al. (1985) mit dem klonierten 21 kb HindIII-Fragment von pJP4 erreichte Aktivität eingetragen (gestrichelt).

gestoppt. Wie aus dem in Abbildung 22 gezeigten Diagramm hervorgeht, wurden 70% der maximal freisetzbaren gasförmigen Radioaktivität bereits innerhalb der ersten Stunde gebildet, woraus sich eine Anfangsgeschwindigkeit von ca. 1000 cpm/min extrapolieren ließ. Dieser Wert liegt um den Faktor 40 über den von Amy et al. (1985) für das in pBR325 klonierte HindIII-Fragment erhaltenen Ergebnissen (ca. 25 cpm/min). Der Faktor von 40 ist niedriger, als man für eine Überexpression mit Hilfe des T7-Promotors erwarten würde, für die Tabor und Richardson (1985) eine bis zu 3000fache

Expression erreichten. Daß sich die hier gemessenen Aktivitäten nicht unbedingt als Maß für die Expression der 2,4-D-monooxygenase darstellen lassen, geht aus einem analogen Versuch mit einer nicht hitzeinduzierten Kultur von E. coli K38 pGP1-2/ pTJS'X535 hervor. Dabei ergaben sich gleich hohe Aktivitäten für die nicht induzierte wie für die induzierte Kultur. Aus den Messungen von Tabor und Richardson (1985) geht hervor, daß beim T7-RNA-Polymerase System im nicht induzierten Zustand bereits 12,5% der maximal möglichen Expression erreicht werden. Es ist somit wahrscheinlich, daß andere Faktoren für die Reaktionsgeschwindigkeit der Freisetzung von CO_2 limitierend wurden. Eine solche Limitierung könnten z.B. Cofaktoren bewirken, die für die Seitenkettenspaltung der 2,4-D-monooxygenase benötigt werden, oder aber Enzyme, welche in diesem System die weitere Umsetzung der abgespaltenen C_2 -Einheit zum Kohlendioxid katalysieren.

8. Insertions-Mutagenese des Gens *tfdA*

8.1. Mutagenese durch in vivo-Insertion von Gammadelta

Gammadelta ist ein 5.7 kb langer DNA-Abschnitt zwischen den Positionen 2.8 kb und 8.5 kb auf der Restriktionskarte des F-Plasmids und dient als eine von drei Sequenzen zur Integration des F-Plasmids in das Chromosom von E. coli unter Ausbildung der sogenannten Hfr-Stämme. Mit Hilfe der Sequenz Gammadelta ist F außerdem in der Lage, mit Plasmiden vom Typ pBR322 Kointegrate zu bilden, die sich dann konjugativ auf andere E. coli-Stämme übertragen lassen. Die Kointegratbildung mit dem Chromosom oder mit anderen Plasmiden führt in jedem Falle zur Verdoppelung der Gammadelta-Sequenz an der Integrationsstelle. Bei der Wiederauflösung des Kointegrats durch homologe Rekombination zwischen den beiden Gammadelta-Sequenzen bleibt eine Kopie von Gammadelta stabil in dem nicht mobilisierbaren Plasmid integriert. Die sequenzunspezifische und von recA unabhängige Transposition vom F-Plasmid auf ein anderes Plasmid zeichnet Gammadelta als Insertions-Sequenz aus (Guyer 1978) und kann zur in vivo-Mutagenese und damit zur Lokalisation von klonierten Genen verwendet werden, wie sie im Folgenden für das Gen tfdA durchgeführt wurde.

8.1.1. Erzeugung von Gammadelta-Plasmidmutanten

Der das F-Plasmid enthaltende Stamm E. coli LC707 wurde mit dem nicht mobilisierbaren Plasmid pTJS'X535 transformiert. Transformanten wurden auf die von pTJS'X535 kodierte Ap-Resistenz selektiert; eine Selektion auf F war wegen dessen ausreichender Stabilität im Wirtsstamm nicht notwendig. Die Ap-resistenten Stämme, welche nun beide Plasmide nebeneinander enthielten, wurden mit dem Stamm E. coli LE392rif gekreuzt, der zur Gegenselektion gegen den Donor eine chromosomal bedingte Resistenz gegen Rifampicin aufwies.

Durch Ausplattieren der Konjugationsmischungen auf Ap- und Rif-haltigem Medium konnten Klone selektiert werden, deren Phänotyp zu 99% auf die konjugative Übertragung eines Kointegrates aus F und pTJS'X535 in LE392rif zurückzuführen war. 1% der Stämme stellten spontan Rif-resistente Donorstämme dar.

8.1.2. Charakterisierung der Gammadelta-Plasmide

Aus den Ap-/Rif-resistenten Transkonjuganten wurde die Plasmid-DNA isoliert und gelelektrophoretisch analysiert. Unter den isolierten Plasmiden befanden sich ausschließlich die mit einer Gammadelta-Insertion versehenen Abkömmlinge von pTJS'X535, nicht jedoch die ursprünglichen Kointegrate, deren Stabilität in E. coli nur gering ist und die zur spontanen Auflösung in ein F-Plasmid und ein mutagenisiertes

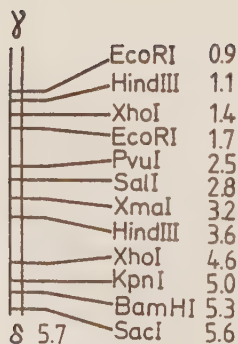


Abbildung 23

Restriktionskarte des Gammadelta-Fragments aus dem F-Plasmid (nach Guyer 1978). Dargestellt sind die Schnittstellen für 9 Enzyme, für ein weiteres Enzym, XbaI, wurde keine Schnittstelle gefunden. Die Zahlenangaben bezeichnen den Abstand der Stellen vom Beginn der Sequenz in kb.

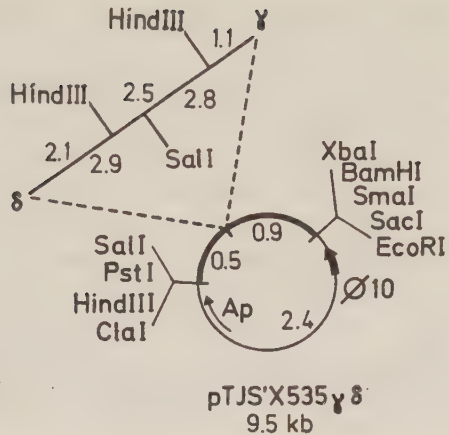


Abbildung 24

Insertion des Gammadelta-Fragments im Plasmid pTJS'X535. Zahlenangaben bezeichnen die Länge der Abschnitte in kb.

Plasmid tendieren. Die mit hoher Kopienzahl in den Zellen vertretenen kleineren pTJS'X535-Derivate wurden dann in einer Schnellpräparation isoliert, bei der die großen F-Plasmide verloren gingen oder zerstört wurden. Durch Restriktionsanalyse der als pTJS'X535-gammadelta bezeichneten mutagenisierten Plasmide mit XbaI und SalI, bzw. mit HindIII konnten die Insertionsstellen von Gammadelta mit einer Genauigkeit von ca. 0.1 kb bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß die untersuchten Plasmide unterschiedliche Insertionsstellen aufwiesen und somit aus individuellen Transpositions-Ereignissen hervorgegangen waren. In Abbildung 23 ist die Restriktionskarte des Gammadelta-Fragmentes dargestellt, Abbildung 24 zeigt das Plasmid pTJS'X535 mit einer Gammadelta-Insertion.

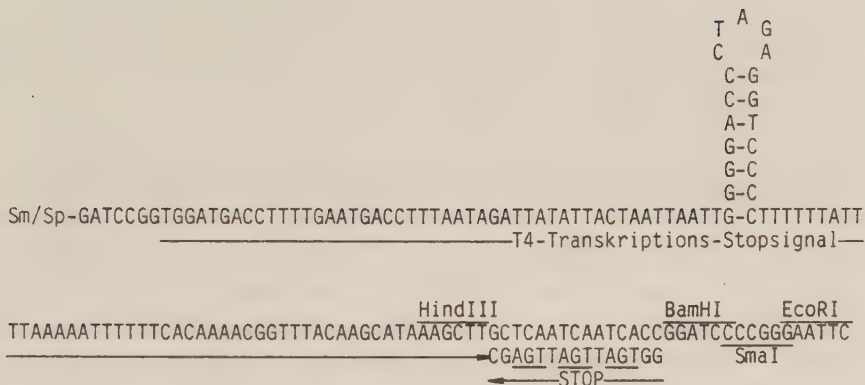
8.1.3. Test auf Genexpression bei Gammadelta-Mutanten

Zum in vivo-Test auf die Funktion der 2,4-D-monooxygenase wurden Zellen von E. coli K38, die pGP1-2 enthielten, mit drei ausgewählten Insertionsmutanten transformiert, bei welchen die Insertionsstellen im Abstand von 0.2, 0.6 und 0.9 kb von der XbaI-Stelle entfernt lagen. Stämme mit beiden Plasmiden wurden spezifisch induziert und durch Bestimmung der Freisetzung von radioaktivem CO₂ aus ¹⁴C-markiertem 2,4-D auf die Expression einer aktiven 2,4-D-monooxygenase getestet: Keines der drei mutagenisierten Plasmide war in der Lage, eine enzymatisch aktive 2,4-D-monooxygenase zu exprimieren.

Wie diese Ergebnisse zeigten, konnte tfdA effektiv durch Insertion von Gammadelta in das 1.4 kb große XbaI/SalI-Fragment von pTJS'X535 inaktiviert werden. Für die beobachteten Fälle einer Inaktivierung von tfdA konnten aber sowohl Insertionen in die kodierende Region als auch eine Beeinflussung von Promotorfunktionen verantwortlich sein. Aufgrund dieser Zweideutigkeit waren keine weitergehenden Rückschlüsse auf die Lage der kodierenden Region von tfdA möglich. In dieser Hinsicht zeigte sich die Mutagenese durch in vitro-Insertion des Omega-Fragmentes in das Plasmid pTJS'X535, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben wird, der Gammadelta-Mutagenese überlegen. Letztere eignet sich deshalb besser zur groben Kartierung von Genen auf längeren DNA-Abschnitten, für die eine Omega-Mutagenese zu aufwendig wäre.

8.2. Mutagenese durch in vitro-Insertion des Omega-Fragments

Aus den Untersuchungen über die Expression von tfdA in A. eutrophus und E. coli konnte gefolgert werden, daß die Aktivität der 2,4-D-monooxygenase durch die Transkription des 1.4 kb Fragmentes von der XbaI- zur SalI-Stelle, gefolgt von der Synthese eines 32.000 Dalton Proteins bedingt war.



8.2.1. Erzeugung von Omega-Plasmidmutanten

Aus den Expressionsversuchen mit tfdA war zu vermuten, daß die zwischen XbaI und SalI gelegene BglII-Stelle in der kodierenden Region von tfdA lag (Punkt 5.2). Da diese Schnittstelle auf dem Plasmid pTJS'X535 nur einmal vorhanden war und die damit erzeugten Enden mit BamHI-Enden kompatibel waren, eignete sie sich für eine Insertion des Omega-Fragments. Dazu wurden pTJS'X535 mit BglII und pDOC37 (Omega) mit BamHI verdaut und miteinander ligiert. Aus transformierten Zellen von E. coli LE392 konnten die gewünschten Rekombinanten dann durch gleichzeitige Selektion auf Ap- und Sp-Resistenz selektiert werden.

8.2.2. Identifizierung eines verkürzten Genprodukts

Das rekombinante Plasmid pTJS'X535-Omega (Abbildung 26) wurde durch Transformation in einen pGP1-2 enthaltenden Stamm E. coli K38 überführt. Die erhaltenen Transformanten wurden

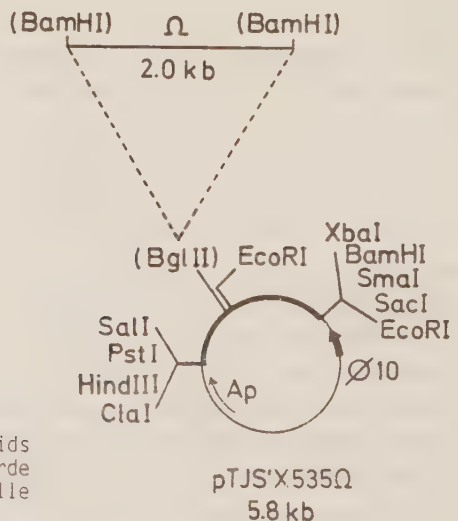


Abbildung 26

Omega-Insertionsmutante des Plasmids pTJS'X535. Das Omegafragment wurde über BamHI-Enden in die BglII-Stelle des Inserts eingesetzt.

durch Hitzeinduktion und Rifampicinzusatz zur Überproduktion von ausschließlich plasmidkodiertem Protein veranlaßt, das dann wie schon unter Punkt 6.2 beschrieben spezifisch radioaktiv markiert und gelelektrophoretisch analysiert wurde. Das in Abbildung 27 dargestellte Autoradiogramm zeigt die Expression eines Proteins, das im Vergleich zu dem von pTJS'X535 exprimierten Genprodukt deutlich verkürzt ist. Aus dem Vergeich mit Standardproteinen ergab sich ein Molekulargewicht von 29.000.

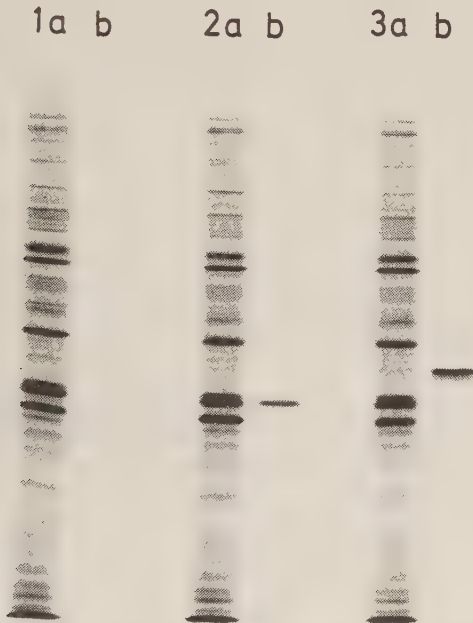


Abbildung 27

Expression eines verkürzten Genprodukts durch eine Insertionsmutante des Gens *tfdA*. Zellen von *E. coli* K38 enthielten pGP1-2 und eines der Plasmide pT7-5 (1), pTJS'X535-Omega (2), pTJS'X535 (3). Zellprotein wurde (a) ohne Induktion des Systems und (b) nach Hitzeinduktion und Rifampicinzugabe radioaktiv markiert, über ein 12.5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

8.2.3. Untersuchung der Genexpression bei Omega-Mutanten

Zellen von E. coli K38, die pGP1-2 und pTJS'X535 oder pTJS'X535-Omega enthielten, wurden spezifisch induziert und durch Bestimmung der Enzymaktivität in vivo auf die Expression einer aktiven 2,4-D-monooxygenase getestet. Wie schon unter Punkt 7 näher ausgeführt, wurde dazu die aus in der Seitenkette markiertem 2,4-D freigesetzte Menge an radioaktivem CO₂ bestimmt. Bei keiner der Omegamutanten konnte dabei eine Aktivität der 2,4-D-monooxygenase gemessen werden, die den Nullwert (pT7-5 ohne Insert) überstieg. Tabelle 14 faßt die Daten zusammen, die sich für zwei unabhängige Omegamutanten und dem nicht mutagenisierten Plasmid aus der Proteinelektrophorese und der Aktivitätsbestimmung ergaben.

Tabelle 14 Expression eines verkürzten, enzymatisch inaktiven Proteins durch die mittels Omega-Insertion mutagenisierten Plasmide in E. coli.

Plasmide	freigesetzte Menge ¹⁴ CO ₂ (kcpm)	Protein- Molekulargewicht
pT7-5	0.3	-
pTJS'X535	70	32.000
pTJS'X535-Omega a	0.4	29.000
pTJS'X535-Omega b	0.3	29.000

9. Bestimmung der DNA-Sequenz des Gens *tfdA*

Die kodierende Region des Gens *tfdA* war durch die vorangegangenen Untersuchungen auf einem 1.4 kb großen *XbaI*/*SalI*-Fragment lokalisiert worden. Für die Bestimmung der Basenfolge von *tfdA* wurde das etwas größere 2 kb *BamHI*/*SalI*-Fragment gewählt, um auch den möglicherweise vor dem Gen gelegenen Promotor zu erfassen.

9.1. Konstruktion der M13-Klone für die Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung des 2 kb *BamHI*/*SalI*-Fragmentes aus pJP4 nach Sanger et al. (1977) wurde zunächst das 2.8 kb *SacI*/*SalI*-Fragment aus einem elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsverdau von pKJS32 isoliert und in die Phagenvektoren M13tg130 und M13tg131 kloniert. Rekombinante Phagen wurden durch Ausbildung weißer Plaques in *E. coli* JM101 identifiziert, die replikativen Formen der Phagen wurden aus transfizierten Zellen von *E. coli* JM101 isoliert und durch Restriktionsanalyse charakterisiert: MJSS'030 (aus M13tg130) und MJSS'031 (aus M13tg131) enthielten das Insert in beiden Orientierungen zur Sequenzierrichtung (Abbildung 28).

Da in einer Sequenzreaktion nach der Didesoxynukleotidmethode durchschnittlich nur etwa 300 Basen sequenziert werden können, mußte die Sequenz des 2 kb großen Fragments aus den Sequenzen von überlappenden Subfragmenten zusammengesetzt werden. Zur Erzeugung der Subklone standen verschiedene Methoden zur Auswahl:

- a) Isolierung definierter Restriktionsfragmente
- b) Partialverdau mit häufig schneidenden Enzymen
- c) Gerichtete Deletion mittels Exonuklease III

Während Methode a einen relativ großen Aufwand bei der Isolierung und Klonierung der Subfragmente erfordert, muß bei Methode b ein großer Überschuß an Klonen sequenziert werden, um bei einer statistischen Verteilung der Subfragmente die

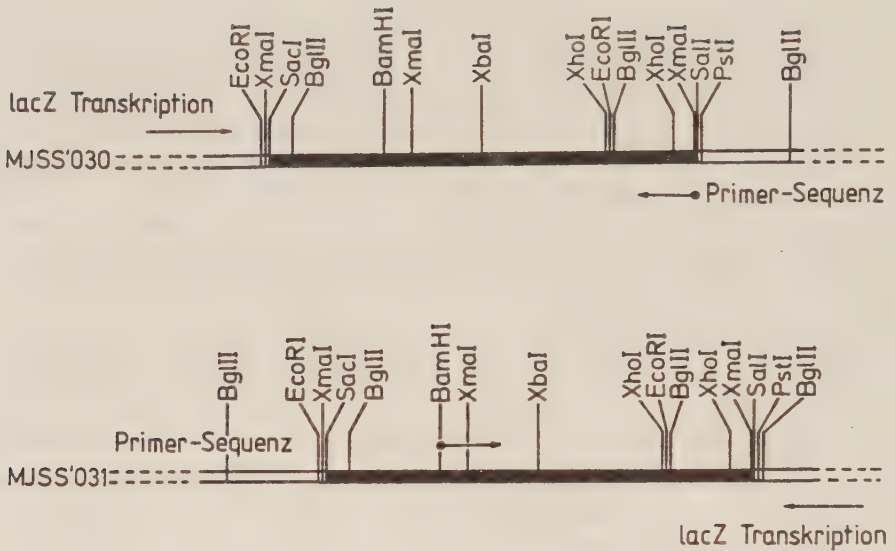
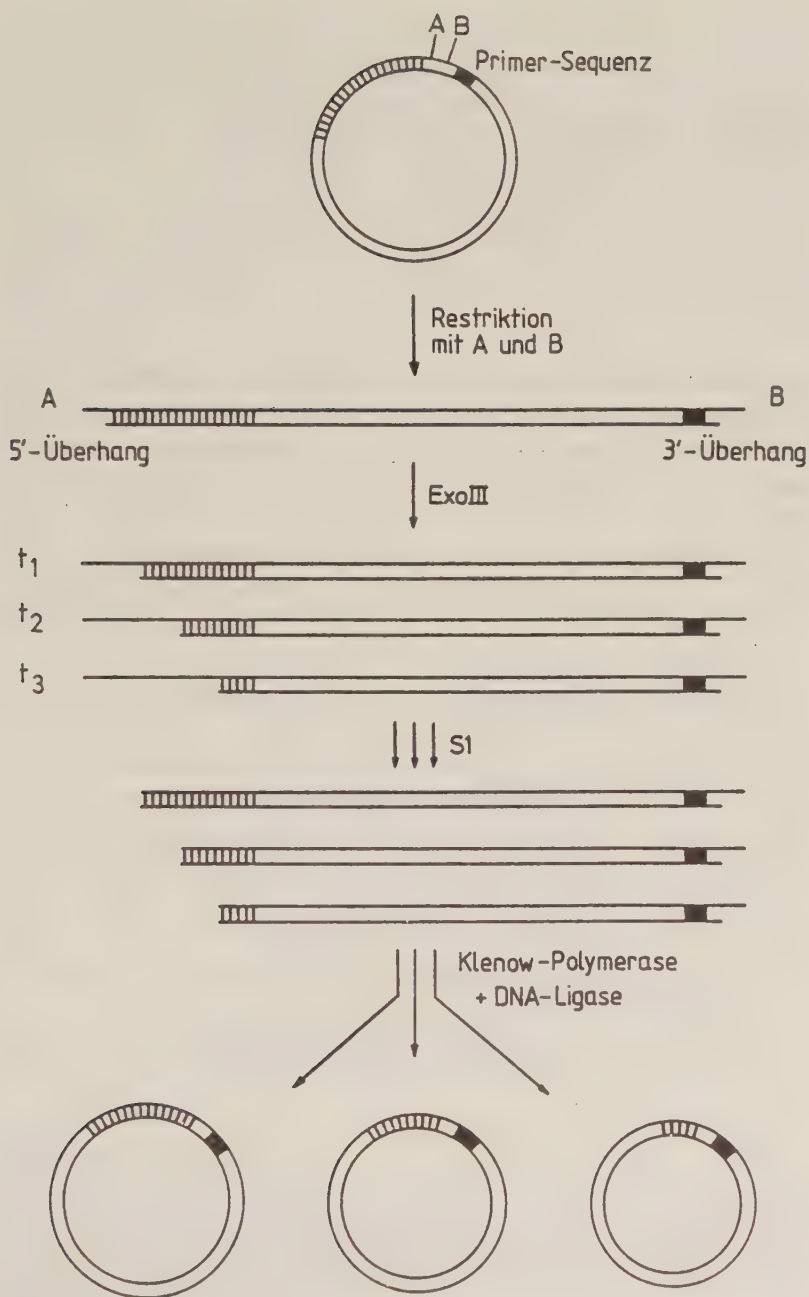


Abbildung 28

Restriktionskarten der rekombinanten M13-Phagen MJSS'030 und MJSS'031. Sie enthalten das 2.8 kb SacI/SalI-Fragment aus pJP4 mit dem Gen *tfdA* in beiden Orientierungen zur Primersequenz. Die Punkte bezeichnen den jeweiligen Beginn der ExonukleaseIII-Deletionen und damit das 5'-Ende des sequenzierten DNA-Stranges.

Abbildung 29

Erzeugung von gerichteten Deletionen für die Sequenzierung längerer DNA-Fragmente (nach Henikoff 1984). Das Plasmid wird mit zwei Restriktionsenzymen verdaut, die nahe bei der Primersequenz ein überhängendes 3'-Ende und nahe bei dem zu sequenzierenden Abschnitt ein überhängendes 5'-Ende erzeugen. Durch Behandlung mit ExonukleaseIII werden spezifisch vom überhängenden 5'-Ende her Deletionen eingeführt. Die Deletionen können durch Entnahme von Proben zu verschiedenen Zeiten gestaffelt werden.



gesamte Länge des Fragments abzudecken. Hier wurde die von Henikoff (1984) entwickelte Methode c verwendet, die sich durch relativ einfache Handhabung auch bei der Sequenzierung längerer Fragmente (5 kb) auszeichnet. Das in Abbildung 29 dargestellte Verfahren beruht auf der Eigenschaft der Exonuklease III, lineare DNA nur von einem überstehenden 5'-Ende, nicht jedoch von einem überstehenden 3'-Ende her abzubauen, wodurch Deletionen nur in einer Richtung entstehen.

Durch Restriktion des rekombinanten Phagen MJSS'030 mit SalI und PstI, sowie durch Restriktion von MJSS'031 mit BamHI und SacI wurden (in Sequenzierrichtung betrachtet) unmittelbar nach der Primersequenz jeweils ein überhängendes 3'-Ende (PstI bzw. SacI) und vor dem zu sequenzierenden Abschnitt ein überhängendes 5'-Ende (SalI bzw. BamHI) erzeugt. Durch Behandlung mit Exonuklease III konnten anschließend Deletionen eingeführt werden, ohne daß die Primersequenz dabei angegriffen wurde. Die Länge der Deletionen wurde durch Abstoppen von Aliquots im Abstand von 35 sec gestaffelt (24 Proben pro Reaktion). Zur Beseitigung des zweiten Stranges wurde nicht die von Henikoff (1984) vorgeschriebene S1-Nuklease (*Aspergillus oryzae*), sondern Mung-Bean-Nuklease (mung bean sprouts) verwendet, da diese im Gegensatz zu S1 eventuelle Strangbrüche im DNA-Molekül nicht angreift. Die gelelektrophoretische Analyse der Proben ergab eine Abbaurrate von 200 bis 300 Nukleotiden pro Minute. Die so verkürzten linearen DNA-Fragmente wurden durch Behandlung mit Klenow-Polymerase und DNA-Ligase wieder in ihre zirkulären Plasmidformen überführt, wodurch die Primersequenzen nun mit jeweils weiter im Segment gelegenen DNA-Abschnitten verknüpft wurden. E. coli JM101 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert und unter den entstandenen Plaques wurden je 4 pro Transformation, d.h. 96 pro Exonuklease Reaktion, zur Isolierung von sowohl Einzel- als auch Doppelstrang-DNA im Schnellverfahren verwendet. Die ungefähre Größe der Deletionen wurde dann durch Restriktionsanalyse der Doppelstrang-DNA bestimmt.

9.2. Sequenzierung der M13-Klone

Von den untersuchten Klonen beider Exonuklease Reaktionen (2 x 96 Klone) wurden 35 ausgewählte Klone sequenziert, die durch ihre Deletionen eine überlappende Sequenzierung beider DNA-Stänge erlaubten. Bei der Elektrophorese der Sequenzreaktionen traten an GC-reichen Sequenzen infolge von DNA-Sekundärstrukturen gelegentlich Kompressionen von Banden auf, besonders wenn die Auftrennung bei 55°C erfolgte. Eine Erhöhung der Geltemperatur auf 65°C bewirkte meist eine Auflösung der kleineren Kompressionen. An den Stellen mit größeren Kompressionen konnte die Sequenz jedoch immer mit Hilfe des Gegenstranges eindeutig aufgeklärt werden. Insgesamt reichten 24 der sequenzierten Klone aus, um aus den

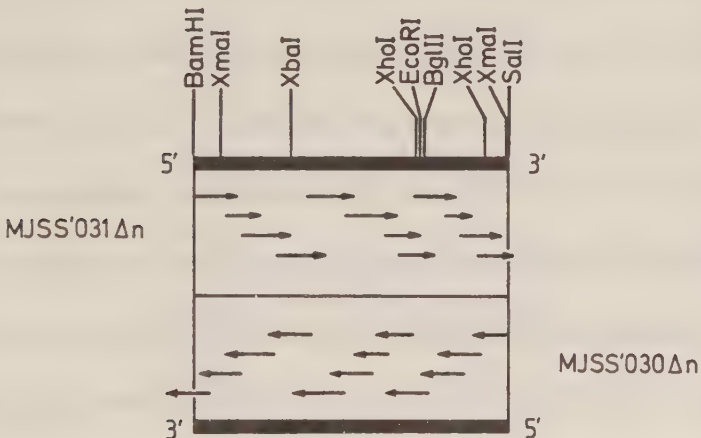


Abbildung 30

Strategie der DNA-Sequenzierung des 2 kb BamHI/SalI-Fragments mit dem Gen *tfdA*. Ausgehend von den rekombinanten M13-Phagen MJSS'030 und MJSS'031 wurden mit Hilfe von ExonukleaseIII deletierte Phagen erzeugt, die in der durch Pfeile angegebenen Richtung sequenziert wurden. Hier sind die 24 Einzelsequenzen dargestellt, aus denen die gesamte Sequenz zusammengesetzt wurde.

20 40 60
GGATCCTGTCTCAGCTGGCGCGCAATGCTCGAACCCGCTGCGATATACAGCCGTTTCGTAG

80 100 120
TGCAGGTGCTCCACCGTGATTCCAGGCTCCTGGGGGTAGAAGCGGCCGACACCGAGATGG

140 160 180
ATGGTGCCGGCAGCGAGGGCCTCGATCTGCCGCACCTTGGGCATCAGGGCCAGAGACAGC

200 220 240
GTCGCCCCCGGGACCGCCTGCGTGAACGCATGGAGCAATGCCGGGACGGTCTGGTAGATC

260 280 300
GCCGTGCCGAGGTAGCCGATATCGAGTTGGCCGATCTCGCCCCGGCTGGCGGCGCGGGAC

320 340 360
CGGTCCACGGAAGTCCGACCCAGTTTCGAGCATGCGCCGTGCATCTTCGAGAAACGCGGCC

380 400 420
CCGGCGGGCGTGAGCTGCACGCCGCGCGCTGCGCTCGAACAACAACACGCCCCAGATGC

440 460 480
TGTTTCGAGCGCGTGAATCTGTGCGTGACCGGGGGCTGGGAAATATGCAGCCGCCGCGCG

500 520 540
GCGGCACCGACGTTGCCCTCCTCCGCGGCAGCAACGAAATAGCGAAGCTGTGAAACTCC

560 580 600
ATTCTTCACTCCTGGTGGCTGGCTCCGGCTGCCGGAGAGCCATACCGATCCCGTATCGCT

620 640 660
CGCGCTGATGGAAGGTATTAGACCATATGGCCCGGCATTTCTAGACTACCGCCATGATAA

680 700 720
AACTCGGCTGCTCTCTCGTCTGTGGAACATCTTCAGGCGCGCTGAGCCGTCTTTTTGAA

740 760 780
ACAGTCTCTTAGAAAAGGAGCAAAAAAGTGAGCGTGCATCGCAAATCCCTTCATCCTCTT

800 820 840
TTCGCGCAGGGGTGGAAGACATCGACCTTCGAGAGGCCTTGGGTTTCGACCGAGGTCCGA

860 880 900
GAGATCGAACGGCTAATGGACGAGAAGTCGGTGTGGTGTTCGGGGGACAGCCCTGAGT

920 940 960
CAGGATCAGCAGATCGCCTTCGCGCGCAATTTCCGGGCCACTCGAAGGCGGTTTCATCAAG

980 1000 1020
GTCAATCAAAGACCTTCGAGATTCAAGTACGCGGAGTTGGCGGACATCTCGAACGTCACT

1040 1060 1080
CTCGACGGCAAGGTGCGCAACGCGATGCGCGCGAGGTGGTCGGGAACCTTCGCGAACCAG

1100 1120 1140
CTCTGGCACAGCGACAGCTCCTTTTCAGCAACCTGCTGCCCGCTACTCGATGCTCTCCGCG

```

      1160      1180      1200
GTGGTGGTTCCGCCGTGGGGCGGCGACACCGAGTTCTGCGACATGCGTGCGGCATACGAC

      1220      1240      1260
GCGCTGCCTCGGGACCTCCAATCCGAGTTGGAAGGGCTGCGTGCCGAGCACTACGCACTG

      1280      1300      1320
AACTCCCGCTTCCTGCTCGGCGACACCGACTATTCCGGAAGCGCAACGCAATGCCATGCCG

      1340      1360      1380
CCGGTCAACTGGCCGCTGGTTCGAACCCACGCCGGCTCCGGGCGCAAGTTTCTCTTCATC

      1400      1420      1440
GGCGCGCACGCGAGCCACGTCTGAAGGCCTTCGGGTGGCCGAAGGCCGGATGCTGCTTGCG

      1460      1480      1500
GAGCTTCTCGAGCACGCGACACAGCGGGAATTCGTGTACCGGCATCGCTGGAACGTGGGA

      1520      1540      1560
GATCTGGTGATGTGGGACAACCGCTGCGTTCTTACCGCGGACGCAGGTACGACATCTCG

      1580      1600      1620
GCCAGGCGTGAGCTGCGCCGGGCGACCACCTGGACGATGCCGTGCTCTAGCGCACGCCA

      1640      1660      1680
TGGCGCACGCCCTTTTTCGGAAGGCCCCACAAGATGTACGCAACCCTGATCAGCGGCAGC

      1700      1720      1740
CGTAGCCTGGACGGCGACACCTTGGCGCAGCGCGTCCTTCGAGCGGCGGGCGGCCTGGCG

      1760      1780      1800
GCATGGGGATTGAGGCCCGGTGATGTCTGTCGCCATCCTCATGCGCAATGACTTTCCGGTG

      1820      1840      1860
CTCGAAATGACGCTGGCCGCGAACC GCGCGGCATCGTTGCGGTGCCTTTGAACTGGCAT

      1880      1900      1920
GCGAACC GGGACGAGATCGCCTTCATCCTCGAGGACTGCAAAGCGCGTGTGCTCGTCGCG

      1940      1960      1980
CACACCGATCTGCTCAAGGGCGTTGCATCCGCGGTGCCGAGGCCTGCAAGGTGCTGGAA

      2000      2020      2040
GCCGCGTCGCCGCCCGAGATCCGGCAGGCCTATCGGCTGTCCGATGCGTGTGACGGCG

AACCCGGGCACGGTTCGAC

```

Abbildung 31

Nukleotidsequenz des Gens *tfdA* und angrenzender DNA-Regionen. Dargestellt ist die 2058 Basen lange Sequenz von der BamHI- bis zur SalI-Erkennungsstelle in der Transkriptionsrichtung des Gens. Start- und Stopkodons des 861 Basen langen offenen Leserahmens sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Einzelsequenzen die komplette Sequenz beider DNA-Stränge des 2 kb BamHI/SalI-Fragmentes zusammenzusetzen. Abbildung 30 zeigt die Strategie der DNA-Sequenzierung mit Hilfe ExoIII-erzeugter, überlappender Deletionen.

9.3. Auswertung der Sequenzdaten

Die Aneinanderreihung der Einzelsequenzen, die jeweils 250 bis 300 Nukleotide beinhalteten und in der Regel Überlappungen von 50 bis 100 Nukleotiden aufwiesen, ergab eine Sequenz mit einer Länge von 2058 Nukleotiden, welche den zwischen BamHI (Position 1) und SalI (Position 2035) gelegenen DNA-Bereich umfaßt. Die Übersetzung der zwischen der XbaI- (Position 640) und der SalI-Stelle (Position 2053) gelegenen Sequenz, auf der gemäß den Expressionsstudien die kodierende Region von tfdA lokalisiert sein mußte, zeigte einen offenen Leserahmen, der bei Position 748 mit einem GTG-Startkodon beginnt und bei Position 1608 vor einem TAG-Stopkodon endet. 7 Nukleotide vom GTG-Startkodon entfernt konnte eine potentielle ribosomale Bindungsstelle mit der S/D-Sequenz 5'-AAGGAG-3' (Shine und Dalgarno 1975) erkannt werden. Die Länge von 861 Nukleotiden dieses offenen Leserahmens stimmte mit der Größe des tfdA-Genprodukts überein, für das über SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 32.000 ermittelt worden war (Punkt 6.2). Abbildung 31 zeigt die Nukleotidsequenz des sequenzierten BamHI/SalI-Fragments mit den Start- und Stopkodons des offenen Leserahmens.

Innerhalb des 861 bp Leserahmens liegen die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI (Position 1468) und BglII (Position 1500). Die Insertion eines DNA-Fragmentes in eine dieser Schnittstellen oder eine Deletion ausgehend von einer dieser Schnittstellen mußten demgemäß den offenen Leserahmen zerstören. Wie schon unter Punkt 8.2 beschrieben, führte die Mutagenese des Plasmids pTJS'X535 durch Insertion des Omega-Fragments in BglII zur Expression eines enzymatisch inaktiven Proteins vom Molekulargewicht

29000, was genau dem im Plasmid pTJS'X535-Omega auf 768 Nukleotide verkürzten Leserahmen (Tabelle 15 und Abbildung 32) entsprach. Ebenso führten bei den das Gen tfdA enthaltenden broad-host-range Plasmiden die von der EcoRI- oder der BglII-Stelle ausgehenden Deletionen immer zum Verlust der Genexpression in A. eutrophus (Punkt 5.2). Somit konnte aus den vorliegenden Ergebnissen eindeutig gefolgert werden, daß es sich bei dem gefundenen offenen Leserahmen um die für das Enzym 2,4-D-monooxygenase kodierende Region des Gens tfdA handelte.

Tabelle 15 Korrelation von 2,4-D-monooxygenase Aktivität, Proteinlänge und offenen Leserahmen in tfdA/pT7-Hybridplasmiden und ihren Insertionsderivaten.

Plasmids	Enzym-aktivität ^a (kcpm)	Protein-Mol.gew. ^b (dalton)	offener Leserahmen ^c (Basenpaare)	Aminosäuren ^d
pT7-5	0.3	-	-	-
pTJS'X535	70	32.000	861	287
pTJS'X535-Ω a	0.4	29.000	768	256
pTJS'X535-Ω b	0.3	29.000	768	256

a gemessene ¹⁴CO₂-Freisetzung

b aus der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

c von GTG (Position 748) bis zum ersten Leserahmenstop

d abgeleitet aus den offenen Leserahmen

EcoRI
1500
HindIII
tfdA-GAATTCGTGTACCGGCATCGCTGGAACGTGGGA|GATCCGGTGATTGATTGAGCAAGCTT-Omega
GluPheValTyrArgHisArgTrpAsnValGly|AspProValIleAsp|
STOP

Abbildung 32 Sequenz des verkürzten Leserahmens an der Insertionsstelle des Omega-Fragmentes bei Position 1500.

10. Anreicherung und Charakterisierung des tfdA-Genprodukts

Eine Bestätigung der als kodierende Region von tfdA identifizierten Sequenz, insbesondere des Starts der Translation, sollte zusätzlich durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren des Genprodukts erbracht werden.

10.1. Reinigung des überexprimierten Proteins aus E. coli

Für die partielle Reinigung des Proteins wurde tfdA mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase/ Promotor-Systems in E. coli überexprimiert. Dazu wurden Zellen von E. coli K38, die pGP1-2 und pTJS535 enthielten, in Vollmedium angezogen, induziert und mit Rifampicin behandelt. Ein kleinerer Teil der Zellen wurde in Minimalmedium zur spezifischen radioaktiven Proteinmarkierung eingesetzt und anschließend mit den in Vollmedium induzierten Zellen gemischt, so daß durch den radioaktiv markierten Anteil die anschließende Anreicherung des Proteins verfolgt werden konnte. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und durch hochtourige Zentrifugation und Filtration wurden partikuläre Bestandteile entfernt. Der so gewonnene Rohextrakt wurde direkt auf eine Ionenaustauschersäule (MonoQ, FPLC) geladen und mit einem KCl-Gradienten eluiert. Durch Messung der Radioaktivität wurden Fraktionen identifiziert, die das angereicherte Protein enthielten. Im Elutionsdiagramm (Abbildung 33) erkennt man einen Proteinpeak (Pfeil), der bei einer KCl-Konzentration von 120 mM eluiert wurde und in dem die gesamte Radioaktivität konzentriert war.

Proben aus den Fraktionen wurden durch Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Coomassie-Färbung des Gels (Abbildung 34) und durch Autoradiographie sichtbar

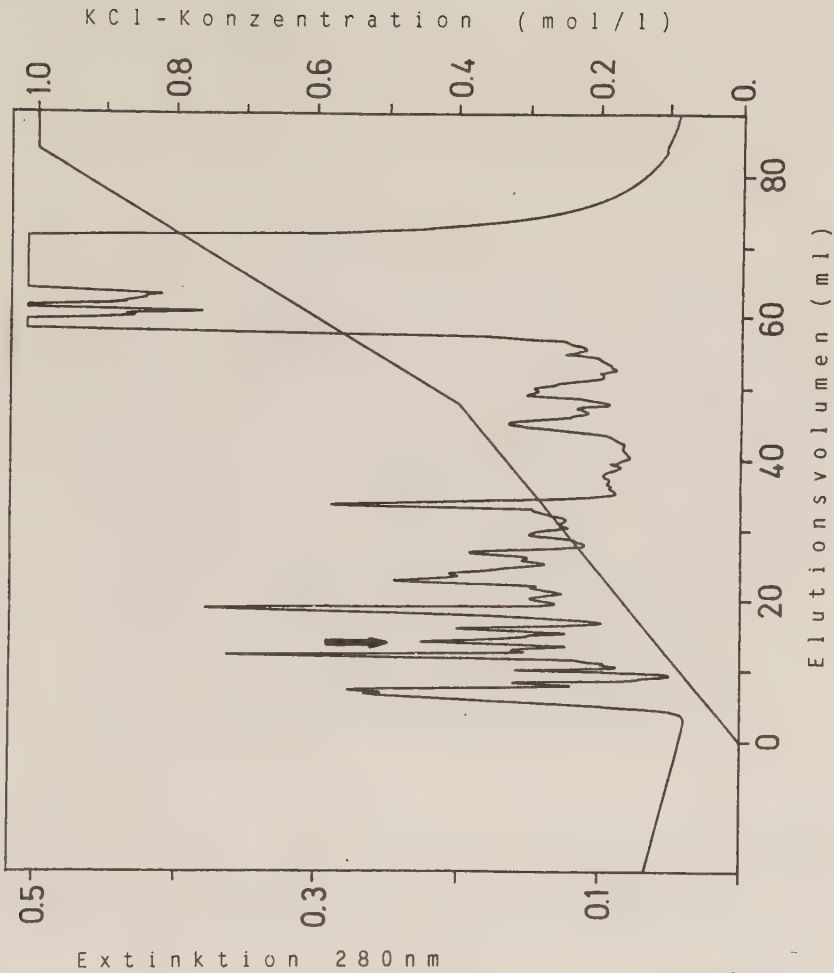


Abbildung 33

Reinigung des in *E. coli* exprimierten und spezifisch markierten tfdA-Genprodukts über Ionenaustauschchromatographie. Der radioaktive Peak im Elutionsdiagramm ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.



Abbildung 34

Gelelektrophoretische Analyse benachbarter Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie. 100 μ l jeder Fraktion wurden gefriergetrocknet, in 100 μ l Auftragspuffer denaturiert und auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Abbildung zeigt ein Coomassie-gefärbtes Gel mit dem 32000 Dalton Protein in Spur 3 und 4.

gemacht. In den entsprechenden Fraktionen zeigte sich eine Proteinbande auf der Höhe von 32.000 Dalton, die sich auch als radioaktiv erwies und den Hauptanteil in den Fraktionen bildete. Daneben waren auf dem mit Coomassie gefärbten Gel ein paar schwächere, nicht radioaktive Banden zu erkennen.

Da die Reinigung in diesem Schritt bereits derart effektiv war, mußte zur Sequenzierung des Proteins nur noch ein weiteres Trennverfahren durchgeführt werden. Dabei wurde das gesamte Protein einer Fraktion über eine SDS-PAGE präparativ aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden nach einem "halbtrockenen" Blotting-Verfahren vom Gel auf Glasfaser übertragen, die nach der von Aebersold et al. (1986) entwickelten und von Eckerskorn (persönl. Mitteilung) modifizierten Methode vorbehandelt war. Nach dem Färben der mit den Proteinen beladenen Glasfaser wurde der Bereich mit der 32.000 Dalton Bande ausgeschnitten und direkt einer Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren unterworfen.

10.2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Sequenzanalyse mit Hilfe des Gasphasen-Sequenzierers (Hewick et al. 1981) und der isokratischen HPLC-Trennung (Lottspeich 1985) erfolgte mit einer Ausbeute von 170 pmol Aminosäuren im ersten Schritt, entsprechend einer eingesetzten Proteinmenge von 5.44 µg, die relative Ausbeute für jeden erfolgten Schritt betrug 94%. Die Sequenzierung ergab die folgenden in ihrer Reihenfolge vom N-Terminus her aufgezählten Aminosäuren:

Ser-Val-Val-Ala-Asn-Pro-Leu-His-

-Pro-Leu-Phe-Ala-Ala-Gly-Val-Glu

Damit stimmten die ersten 16 Aminosäuren am N-Terminus des als tfdA-Genprodukt identifizierten Proteins mit der aus der Nukleotidsequenz (Abbildung 31, Position 751 bis 798) abgeleiteten Aminosäurefolge überein. Die normalerweise vom Startkodon GTG translatierte Aminosäure Formyl-Methionin wurde offensichtlich nachträglich vom wachsenden Polypeptid abgespalten. Anderenfalls hätte entweder Methionin als erste Aminosäure detektiert werden müssen, oder beim Vorliegen von Formyl-Methionin wäre die Sequenzreaktion blockiert gewesen.

Aus den durch DNA- und Proteinsequenzierung gewonnenen Daten (Punkt 9 und 10) ließ sich die gesamte Aminosäuresequenz des von tfdA exprimierten Proteins aufstellen, wie sie in Abbildung 35 dargestellt ist.

Abbildung 35

Primär- und Sekundärstruktur des tfdA-Genprodukts (2,4-D-monooxygenase). Die Aminosäuresequenz wurde aus der DNA-Sequenz abgeleitet, die Aminosäuren 1 bis 16 wurden zusätzlich durch Sequenzieren des Proteins bestimmt. Die unterhalb der Sequenz abgebildete wahrscheinliche Sekundärstruktur wurde nach der Methode von Garnier et al. (1978) ermittelt. Stellen, an denen diese Vorhersage mit der Methode von Chou und Fasman (1978) übereinstimmt, sind mit einem Punkt gekennzeichnet. A = Helix, B = Faltblatt, T = Schleife, Leerraum = gestreckte Konformation.

SerValValAlaAsnProLeuHisProLeuPheAlaAlaGlyValGluAspIleAspLeu	10	20
B B B A T .	A A A A A A A A A A	
ArgGluAlaLeuGlySerThrGluValArgGluIleGluArgLeuMetAspGluLysSer	30	40
A A A A A A A A A A A A A A A A		
ValLeuValPheArgGlyGlnProLeuSerGlnAspGlnGlnIleAlaPheAlaArgAsn	50	60
B B B B B T T . T T T T A A A A A .		
PheGlyProLeuGluGlyGlyPheIleLysValAsnGlnArgProSerArgPheLysTyr	70	80
T T . . T B B B B B T T T T T T T T A		
AlaGluLeuAlaAspIleSerAsnValSerLeuAspGlyLysValAlaGlnArgAspAla	90	100
A A A A A A B B . T T B B A A A A A A		
ArgGluValValGlyAsnPheAlaAsnGlnLeuTrpHisSerAspSerSerPheGlnGln	110	120
A A B . . T T T B T		
ProAlaAlaArgTyrSerMetLeuSerAlaValValValProProSerGlyGlyAspThr	130	140
T T . B B B B B B B T T T T		
GluPheCysAspMetArgAlaAlaTyrAspAlaLeuProArgAspLeuGlnSerGluLeu	150	160
B B B A A A A A A A A A A A A A A A A		
GluGlyLeuArgAlaGluHisTyrAlaLeuAsnSerArgPheLeuLeuGlyAspThrAsp	170	180
A A A A A A A A A . . A B B B B T T T		
TyrSerGluAlaGlnArgAsnAlaMetProProValAsnTrpProLeuValArgThrHis	190	200
T T B A A . . T T B B B		
AlaGlySerGlyArgLysPheLeuPheIleGlyAlaHisAlaSerHisValGluGlyLeu	210	220
T T T B B B A A A A A A A A A A A		
ProValAlaGluGlyArgMetLeuLeuAlaGluLeuLeuGluHisAlaThrGlnArgGlu	230	240
A A A A A A A A A A A A A A A A A A		
PheValTyrArgHisArgTrpAsnValGlyAspLeuValMetTrpAspAsnArgCysVal	250	260
T T T T T B B B B T T T T B		
LeuHisArgGlyArgArgTyrAspIleSerAlaArgArgGluLeuArgArgAlaThrThr	270	280
B T T T T T T T T T A A A A A A A A		
LeuAspAspAlaValVal		

11. Analyse der DNA- und Proteinsequenz

Die folgenden Analysendaten wurden im Wesentlichen mit Hilfe der beschriebenen Computerprogramme erstellt.

11.1. DNA-Sequenz

11.1.1. Allgemeine DNA-Eigenschaften

Die Analyse der Basenhäufigkeit (Tabelle 16) zeigt einen hohen GC-Gehalt von 64.1 mol%. Dieser Wert entspricht damit relativ gut dem GC-Gehalt von 63.7 mol%, der von Amy et al. (1985) für die chromosomale DNA von A. eutrophus JMP134 ermittelt wurde. Analysiert man die Verteilung der Basen über die Gesamtlänge der DNA in Intervallen von 25 Basen, so erhält man vier AT-reiche Regionen, in denen der AT-Gehalt signifikant über 50% liegt (Tabelle 16). Diese Bereiche kommen vor allem für eine Suche nach potentiellen Promotorstrukturen und Bindungsstellen für Regulatorproteine in Betracht.

Tabelle 16 Häufigkeit der Basen in der 2058 Nukleotide langen DNA-Sequenz (Abbildung 31).

Basen	Anzahl	Prozent
A	372	18.1
C	659	32.0
G	661	32.1
T	366	17.8
A+T	738	35.9
C+G	1320	64.1
Purin	1033	50.2
Pyrimidin	1025	49.8

A+T reiche Regionen (AT/ATGC > 0.5)
1. Pos. 520 - 540
2. Pos. 600 - 660
3. Pos. 710 - 750
4. Pos. 950 - 990

11.1.2. Suche nach spezifischen Sequenzen

Auf der 2058 Nukleotide langen DNA-Sequenz wurden die Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen lokalisiert (Tabelle 17). Die kalkulierten Abstände zwischen den einzelnen Schnittstellen stimmten mit den bereits bekannten Daten aus der Restriktionsanalyse des Fragments überein (Punkt 3). Tabelle 18 enthält Enzyme, für die auf dem sequenzierten DNA-Abschnitt keine Erkennungssequenz vorhanden ist.

Es wurde auch eine Suche nach direkt und indirekt repetitiven Sequenzen (direct and indirect repeats) sowie nach Palindromen durchgeführt. Art und Häufigkeit dieser Sequenzen ließen jedoch keine Rückschlüsse auf funktionelle Beziehungen zu. Repetitionen mit einer Länge von 9 und mehr Basen sind in den Tabellen 19 und 20 zusammengefaßt.

11.1.3. Homologie zu bekannten DNA-Sequenzen

Die DNA-Datenbanken "GenBank" (NIH) und die "EMBL"-Datenbank wurden nach Homologien zu dem sequenzierten 2058 Basenpaare langen DNA-Abschnitt abgesucht. Dabei konnten keine signifikanten Homologien (>77% auf einer Länge von 43 bp) gefunden werden.

11.2. Analyse der funktionellen Sequenzen von *tfdA*

Unter funktionellen Sequenzen werden hier die kodierende Sequenz von *tfdA* mit der ihr typischen Verwendung der Basentriplets (Kodons) sowie die Initiationsstelle der Translation verstanden. Mögliche Promotorstrukturen werden später im Diskussionsteil dieser Arbeit besprochen werden.

Tabelle 17 Positionen von Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen auf dem in Abbildung 31 dargestellten 2058 Basen langen BamHI/SalI-Fragment.

AluI	14 374 527 1080 1097 1443 1572
AsuI	137 167 191 297 302 357 629 834 934 1212 1643 1754
AsuII	1341
AvaI	187 1208 1447 1888 1957 1993 2043
AvaII	191 297 302 834 1212
BamHI	1
BclI	1667
BglI	1691
BglII	1500
BssHII	18 384 386 698 922 1048 1382
BstNI	83 90 552 1563 1591 1687 1735
CauII	189 190 223 283 362 451 633 884 1360 1580 1758 1868 2045 2046
CfrI	103 268 1330 1415 1559 1814
DdeI	10 703 728 895
DraII	137 1212 1643
EcoRI	1468
EcoRII	81 88 550 1561 1589 1685 1733
EcoRV	260
EspI	703
Fnu4HI	38 103 150 290 356 375 382 391 468 471 474 479 482 506 509 569 668 785 889 1115 1161 1190 1204 1237 1318 1333 1432 1524 1573 1674 1677 1708 1724 1731 1739 1817 1982 1990
FnuDII	20 294 355 384 386 388 430 443 476 478 505 602 700 922 924 991 1036 1043 1050 1052 1072 1138 1201 1384 1390 1456 1538 1638 1712 1819 1826 1905 1918 1951 1984
FokI	132 1440
FokI*	784 1785 1896 1958
GdiII	103 268 1330 1415 1814
HaeI	817 1406 1963 2008
HaeIII	105 139 169 270 358 630 817 936 1332 1406 1417 1424 1561 1644 1733 1755 1816 1963 2008
HgaI	188 761 1721 1993 2035
HgiAI	70 1250 1454 1802 1913 2035
HgiCI	123 483 1842 1953
HhaI	20 22 294 335 386 388 390 395 430 478 604 700 702 924 926 1038 1050 1052 1203 1302 1364 1384 1386 1577 1613 1625 1707 1712 1784 1828 1905 1920
HindII	1326
HinfI	78 434 897 980
HinPII	18 20 292 333 384 386 388 393 428 476 602 698 700 922 924 1036 1048 1050 1201 1300 1362 1382 1384 1575 1611 1623 1705 1710 1782 1826 1903 1918
HpaII	127 188 221 282 300 361 449 565 572 632 882 1321 1352 1358 1411 1425 1479 1578 1757 1795 1829 1866 2001 2044
HphI	1518 1771
HphI*	1539
MaeI	641 1608
MaeII	490 1013 1397 1493
MaeIII	444
MboI	1 143 236 272 586 842 903 911 1500 1667 1874 1926 1997

Tabelle 17 - Fortsetzung

MboII	808
MboII*	349 549 697 1379 1536
MnlI	150 507 510 785 1217 1225 1786 1897
MnlI*	255 820 838 1060 1758 1897 1966
MstI	1783
NaeI	128 1353 1830
NcoI	1618
NdeI	625
NlaIII	212 333 656 1185 1317 1622 1745 1782 1861
NlaIV	3 87 125 192 298 359 485 563 1148 1213 1356 1645 1844 1955
NruI	1072 1638
NspHI	333 1185 1861
PvuII	14
RsaI	988 1477 1549 1657
SacII	506 1139 1539 1952
SalI	2053
ScrFI	83 90 188 189 222 282 361 450 552 632 883 1359 1563 1579 1591 1687 1735 1757 1867 2044 2045
SfaNI	170 349 1491 1841 1954
SfaNI*	424 1053 1136 1436 1605 2031
SmaI	189 2045
SphI	333 1861
StuI	817 1406 1963 2008
StyI	155 818 1618 1700
TaqI	29 142 262 325 346 397 424 531 794 803 810 826 845 941 976 1009 1022 1126 1341 1400 1448 1719 1802 1889
Tth111I	179
XbaI	640
XhoI	1447 1888
XhoII	1 1500 1997
XmaI	187 2043
XmaIII	103
XmnI	690 1406

Tabelle 18 Restriktionsenzyme, die nicht in dem 2058 Basen
langen BamHI/SalI-Fragment schneiden.

AatII	AhaIII	BanII	DraIII	KpnI	NsiI	SauI	SspI
AccI	ApaI	BbeI	HaeII	MluI	PstI	ScaI	
AcyI	Asp718	BstEII	HgiJII	NarI	PvuI	SfiI	
AflI	AvrII	BstXI	HindIII	NheI	RsrII	SnaBI	
AflIII	BalI	ClaI	HpaI	NotI	SacI	SpeI	

Tabelle 19 Direkt repetitive Sequenzen

Länge (Basen)	Fragment ab Base	wiederholt von Base	Sequenz (5'-3')
12	1161	1278	CGGCGACACCGA
11	805	971	GACCTTCGAGA
10	1161	1692	CGGCGACACC
10	1278	1692	CGGCGACACC
9	380	472	CGCCGCGCG
9	18	922	GC GCGCAAT
9	1036	1300	GC GCAACGC
9	1003	1552	GACATCTCG
9	1611	1623	GC GCACGCC
9	1479	1829	CCGGCATCG
9	1135	1948	TCCGCGGTG

Tabelle 20 Indirekt repetitive Sequenzen (IR) und Palindrome (P)

Länge (Basen)	Fragment ab Base	wiederholt von Base	Sequenz (5'-3')	Typ
16	470	470	GCCGCCGCGCGGGC	P
12	1156	1986	TCGGCGGCGAC	IR
11	393	421	GC GCTCGAACA	IR
10	25	323	ATGCTCGAAC	IR
10	124	124	GTGCCGGCAC	P
10	297	297	GGACCGGTCC	P
10	1338	1338	GGTTCGAACC	P
10	1313	1737	CCATGCCGCC	IR
10	1198	1707	GACGCGCTGC	IR
10	1402	1402	GAAGGCTTC	P
10	1616	1616	CGCCATGGCG	P
10	1886	1886	TCCTCGAGGA	P
9	380	475	CGCCGCGCG	IR
9	217	631	AATGCCGGG	IR
9	49	846	AGCCGTTCTG	IR
9	821	1341	TGGGTTCTGA	IR
9	1073	1335	CGAACCAGC	IR
9	920	1047	TCGCGCGCA	IR
9	1135	1534	TCCGCGGTG	IR
9	1595	1830	ACGATGCCG	IR
9	1068	1635	CTTCGCGAA	IR
9	1534	1948	CACCGCGGA	IR

11.2.1. Kodonverwendung

Die Verwendung der Kodons im Strukturgenen von tfdA zur Proteinbiosynthese ist in Tabelle 21 dargestellt. Dort wo mehrere Kodons für eine Aminosäure zur Verfügung stehen, überwiegen solche mit einem G oder einem C in der dritten Position, was aufgrund des hohen GC-Gehaltes zu erwarten war. Die Häufigkeit der Basen auf den verschiedenen Triplettspositionen (Tabelle 22) zeigt die ungleiche Verteilung, wie sie für kodierende Regionen typisch ist (Tabelle 23). So überwiegen in der ersten Position G und C, in der zweiten Position A und T. Die Purin/Pyrimidin-Verteilung folgt dem RNY-Schema, das besagt, daß in der ersten Position Purine ($R=A+G$) und in der dritten Position Pyrimidine ($Y=C+T$) überwiegen, während in der zweiten Position das Verhältnis Purin/Pyrimidin ($N=A+C+G+T$) ausgeglichen ist (Eigen 1978). Die beschriebenen Eigenschaften werden häufig zum Auffinden kodierender Regionen auf der DNA benutzt (Shepherd 1981, Staden 1984). Die Erfüllung dieser Bedingungen durch die kodierende Sequenz von tfdA bestätigt somit den Leserahmen des Gens, der aufgrund anderer Untersuchungen gefunden wurde.

11.2.2. Ribosomale Bindungsstellen und Translationsstart

Die Analyse der 5'-untranslatierten Region vor dem Translationsstart GTG ergab eine eindeutige Übereinstimmung mit den Regeln, welche von Stormo et al. (1982) auf der Basis eines Vergleichs von 124 Gen-Anfängen für ribosomale Bindungsstellen (Shine/Dalgarno-Sequenzen und Initiationskodons) in E. coli abgeleitet wurden:

- a) Sechs Nukleotide (5'-AAGGAG-3') sind komplementär zur 16S rRNA, wobei das AGG einen Abstand von 9 Nukleotiden zum Startkodon GTG hat.
- b) An der Position -3 steht ein A.
- c) Die Positionen -1 bis -7 enthalten kein G.

Tabelle 21 Kodon-Verwendung und Art der Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese der von *tfdA* kodierten 2,4-D-monooxygenase.

[illegible]

Tabelle 22 Anzahl der Basen auf den verschiedenen Triplettspositionen im Gen tfdA (286 Kodons = 858 bp).

Pos.	T	C	A	G	C/T	G/A	CG/AT	Pu/Py
N--	42	86	46	112	2.05	2.44	2.25	1.23
-N-	80	63	83	60	0.79	0.72	0.76	1.00
--N	35	123	27	101	3.51	3.74	3.61	0.81
NNN	157	272	156	273	1.73	1.75	1.74	1.00

Tabelle 23 Durchschnittliche Häufigkeit der Basen an den verschiedenen Triplettspositionen, angegeben in Basen pro 1000 Nukleotide (nach Staden 1984).

A. für einen Durchschnitt aus 314 Proteinfamilien (Dayhoff 1969)

Pos.	T	C	A	G	C/T	G/A	CG/AT	Pu/Py
N--	184	193	272	351	1.05	1.29	1.20	1.66
-N-	238	246	317	199	1.03	0.63	0.80	1.07
--N	255	255	238	253	1.00	1.06	1.03	0.96
NNN	226	231	276	268	1.03	0.97	1.00	1.19

B. für das stark exprimierte ompA-Gen aus E. coli

Pos.	T	C	A	G	C/T	G/A	CG/AT	Pu/Py
N--	136	217	251	396	1.60	1.58	1.58	1.84
-N-	234	263	324	179	1.12	0.55	0.79	1.01
--N	298	338	142	223	1.14	1.57	1.28	0.57
NNN	223	273	239	266	1.23	1.11	1.17	1.02

C. für alle kodierenden Sequenzen in der EMBL-Sequenzdaten-Bank

Pos.	T	C	A	G	C/T	G/A	CG/AT	Pu/Py
N--	173	210	285	332	1.21	1.17	1.18	1.61
-N-	275	238	309	178	0.87	0.58	0.71	0.95
--N	262	278	207	253	1.06	1.23	1.13	0.85
NNN	237	242	267	254	1.02	0.95	0.99	1.09

Diese Daten bestätigten die allgemeine Erfahrung, daß die hauptsächlich für E. coli aufgestellten Regeln auch für Gene aus anderen gramnegativen Organismen wie A. eutrophus und P. putida zutreffen. Eine Suche nach potentiellen Startsignalen für die Gentranslation auf dem 2 kb DNA-Fragment mit Hilfe von Computerprogrammen erbrachte dagegen keinen Hinweis auf eine ribosomale Bindungsstelle. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß die verwendeten Programme nur Gen-Anfänge mit einem ATG-Startkodon erkannten, da die Einbeziehung des relativ selten vorkommenden Translationsstarts GTG (4 von 124) die Effektivität von Suchprogrammen stark reduzieren würde (Stormo et al. 1982).

11.3. Aus der Aminosäurefolge abgeleitete Proteineigenschaften

11.3.1. Hydrophobizität

Für die aus der DNA-Sequenz von tfdA abgeleitete Aminosäuresequenz wurden hydrophile und hydrophobe Regionen nach der Methode von Hopp und Woods (1981) vorhergesagt. Abbildung 36 zeigt die relativ gleichmäßige Verteilung der Bereiche über die gesamte Länge des Proteins. Dabei stehen wenigen stark hydrophoben Regionen mehrere ausgesprochen hydrophile Bereiche gegenüber, so daß sich im Ganzen ein überwiegend hydrophiler Charakter des tfdA-Genprodukts erkennen läßt.

11.3.2. Sekundärstruktur

Für das Protein wurden wahrscheinliche Sekundärstrukturen nach zwei verschiedenen Methoden ermittelt (Garnier et al. 1978, Chou und Fasman 1978). In Abbildung 35 sind die nach Garnier et al. (1978) vorhergesagten Konformationen Helix (A), Faltblatt (B), Schleife (T) und gestreckte

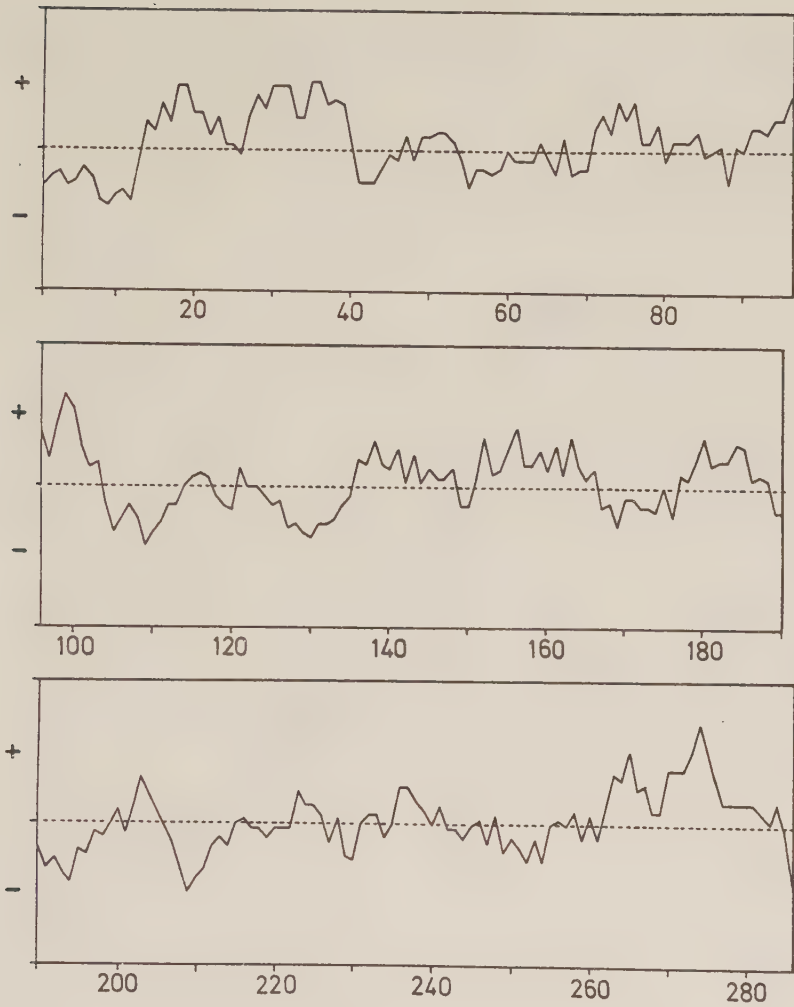


Abbildung 36

Hydrophilie des *tfdA*-Genprodukts, bestimmt nach der Methode von Hopp und Woods (1981). Hydropile Regionen sind durch positive Werte, hydrophobe Regionen durch negative Werte gekennzeichnet.

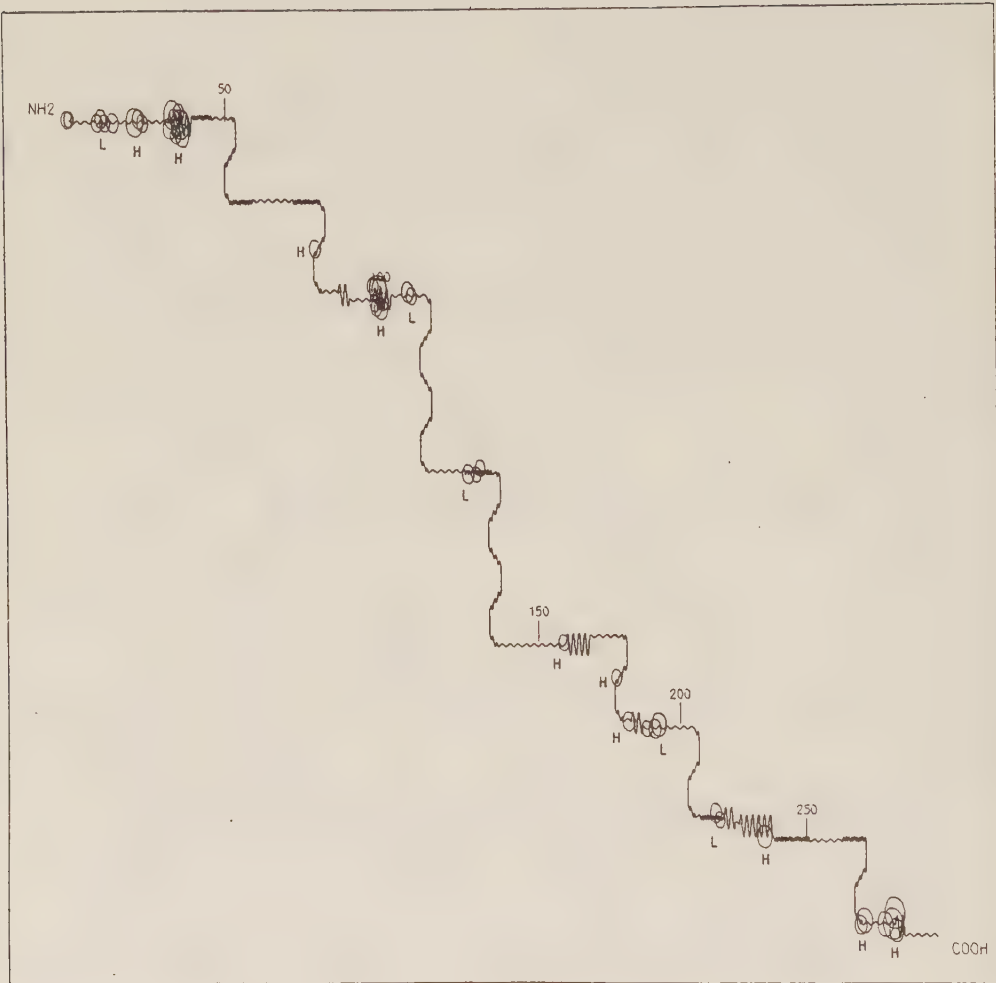


Abbildung 37

Graphische Darstellung der Hydrophilie und Sekundärstruktur des *tfdA*-Genprodukts. Die Vorhersage der Sekundärstruktur beruht auf der Methode von Chou und Fasman (1974). Kreise bezeichnen besonders hydrophile (H) und besonders hydrophobe (L) Regionen. Weitere Symbole sind:

() Helix, () Faltblatt, () Schleife

Konformation (Leerraum) entlang der Aminosäuresequenz aufgezeichnet und jeweils mit einem Punkt gekennzeichnet, wo sie mit den nach Chou und Fasman (1978) bestimmten starken Strukturen übereinstimmen. Dies ist in etwa 60% der Positionen der Fall. Abbildung 37 zeigt die graphische Darstellung der Sekundärstruktur nach Chou und Fasman (1978), zusätzlich sind die besonders hydrophilen und hydrophoben Bereiche hervorgehoben.

11.3.3. Homologie zu bekannten Proteinsequenzen

Die in der NBRF-Datenbank (Stand: Juli 1986) gespeicherten Proteine wurden nach partiellen Homologien zum tfdA-Genprodukt abgesucht. Dabei konnten keine Übereinstimmungen festgestellt werden, die mehr als 11 identische Aminosäuren auf eine Länge von 21 Aminosäuren ausmachten. Das tfdA-Genprodukt wurde zudem noch genauer mit zwei Proteinen verglichen, welche aufgrund ihrer Herkunft und ihrer Funktion zueinander in Verwandtschaft stehen könnten. Dabei handelte es sich einmal um die Sequenz des Cytochrom P-450_{cam} aus P. putida (Haniu et al. 1982), einer löslichen Monooxygenase vom Molekulargewicht 47000. Zum anderen wurde die vom alkB-Gen abgeleitete Proteinsequenz der Alkanhydroxylase (M. Kok, Groningen, persönl. Mitteilung) untersucht, einer membrangebundenen Monooxygenase aus P. oleovorans vom Molekulargewicht 38000, welche langkettige Kohlenwasserstoffe zu Alkoholen hydroxyliert und damit deren Verwendung als C-Quelle ermöglicht. Die drei betreffenden Proteine zeigten untereinander keinerlei Homologie in ihrer Primärstruktur. Auch in der Häufigkeit und Verteilung bestimmter Aminosäuren, sowie in der Sekundärstruktur waren keine signifikanten Gemeinsamkeiten festzustellen.

IV. DISKUSSION

Die Fähigkeit des Bakterienstammes A. eutrophus JMP134, das Herbizid 2,4-D als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zum Wachstum zu nutzen, basiert auf der Funktion mehrerer Enzyme, die den Metabolismus dieser aromatischen Verbindung bis zu den Produkten des Primärstoffwechsels katalysieren. Aufgrund der biochemischen Untersuchungen, welche zunächst die Art und Abfolge der enzymatischen Zwischenschritte in diesem Abbauweg aufklärten, wurde die Existenz der sogenannten tfd-Strukturgene postuliert, die nach ihrer Zuordnung zu den einzelnen Schritten mit tfdA, tfdB usw. bezeichnet wurden. Das Gen tfdA sollte somit den ersten Schritt im bakteriellen Abbau des Herbizids 2,4-D kodieren, der aus einer oxidativen Abspaltung der Acetat-Seitenkette unter Bildung von 2,4-Dichlorphenol besteht.

Über die Lage des Gens tfdA war zunächst nichts bekannt. Zwar konnte nachgewiesen werden, daß die Fähigkeit zum 2,4-D-Abbau von dem 80 kb großen Plasmid pJP4 vermittelt wird, da diese Fähigkeit jedoch nur in wenigen Bakterienarten exprimiert wird, konnte eine Beteiligung chromosomaler Gene am Abbau oder Transport des Herbizids nicht ausgeschlossen werden.

Erst durch die Transposonmutagenese von pJP4 (Don et al. 1985) wurden fünf der Gene, tfdB bis tfdF, auf dem Plasmid pJP4 lokalisiert. Die Lage des Gens tfdA blieb hierbei jedoch unklar, so daß die Autoren auch eine Lokalisation des Gens auf dem Chromosom von A. eutrophus JMP134 diskutierten. Die Untersuchungen von Amy et al. (1985) erbrachten dagegen den ersten Hinweis, daß tfdA ebenfalls auf pJP4 liegen mußte. Sie hatten mit Hilfe eines radioaktiven Enzymtests festgestellt, daß ein kloniertes, 21 kb großes Subfragment von pJP4 die Fähigkeit zur Abspaltung der Acetat-Einheit des 2,4-D exprimierte.

Im Verlauf der hier beschriebenen Arbeit, deren Ziel letztlich die Strukturaufklärung des Gens tfdA war, wurden zunächst verschiedene Wege eingeschlagen, um das Gen zu lokalisieren und zu klonieren.

1. Strategie der tfdA-Klonierung

Die ursprünglich angewandte Strategie, eine Genbank von pJP4-Fragmenten mit Hilfe von broad-host-range-Vektoren in E. coli anzulegen und die so klonierten Fragmente nach Transfer in einen plasmidfreien A. eutrophus auf Expression des Tfd-Phänotyps zu testen, hat nicht zur Detektion von Tfd-Funktionen geführt.

Mit dieser Methode wäre eine unmittelbare Identifizierung des Gens tfdA möglich gewesen, wenn nur der erste katabolische Schritt auf dem Plasmid und alle anderen Tfd-Funktionen auf dem Chromosom kodiert worden wären. Eine solche Genorganisation hatte man zunächst aufgrund von Untersuchungen an anderen 2,4-D-abbauenden Organismen angenommen, wonach der von seinem Plasmid pJP1 kurierte Stamm A. eutrophus JMP116 die Fähigkeit zum Wachstum auf 2,4-D verlor, aber weiterhin das Folgeprodukt der ersten Reaktion, 2,4-Dichlorphenol, verwerten konnte (Fisher et al. 1978).

Die Wiederherstellung des Tfd-Phänotyps plasmidfreier Derivate von JMP134 durch Komplementation mit klonierten Plasmidfragmenten wäre auch dann gelungen, wenn alle tfd-Gene in enger Nachbarschaft auf einem ausreichend großen Restriktionsfragment von pJP4 lokalisiert gewesen wären. Daß diese Vorgehensweise jedoch mit Schwierigkeiten verbunden war, zeigten auch die Untersuchungen von Ghosal et al. (1985b), denen es nicht gelang, einen 2,4-D⁺ Klon aus der EcoRI-Genbank von pJP4 zu erhalten. Ein partieller HindIII-Verdau lieferte ihnen einen einzigen Klon mit 2,4-D

abbauender Eigenschaft, über dessen Zusammensetzung aber nicht näher berichtet wurde.

Es schien deshalb vorteilhafter, das Gen tfdA zuerst über eine Transposonmutagenese zu lokalisieren, wie sie bereits von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich zur Identifizierung von Genen aus Gram-negativen Bakterien eingesetzt worden war. So wurde der Stamm A. eutrophus JMP134 nach der Methode von Simon et al. (1983) mit dem Transposon Tn5 mutagenisiert. Während Don und Pemberton (1985) bei der von ihnen durchgeführten Transposonmutagenese des Plasmids pJP4 zwar fünf der tfd-Gene inaktivieren konnten, jedoch unter den Mutanten keine Insertionen im Gen tfdA fanden, wurden im Verlauf der hier beschriebenen Arbeit zwei Mutanten isoliert, die in der Funktion des Gens tfdA inaktiviert waren.

Eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der Art der verwendeten Verfahren der Transposonmutagenese begründet sein, die sich in wesentlichen Punkten unterscheiden. Don und Pemberton (1985) erhielten Insertionsmutanten von pJP4, indem sie einen pJP4-haltigen A. eutrophus-Stamm, der eine chromosomale Transposoninsertion trug, mit einem plasmidfreien A. eutrophus kreuzten. Transkonjuganten wurden dann auf die vom Transposon kodierte Antibiotikaresistenz selektiert, die in der Form von transposonhaltigen pJP4-Derivaten transferiert worden war. Bei der Methode von Simon et al. (1983) werden Mutanten dagegen dadurch erzeugt, daß ein Tn5-Trägerplasmid konjugativ in den Wildtyp-Stamm überführt wird. Da sich das Trägerplasmid selbst nicht in A. eutrophus vermehren kann, können Tn5-Mutanten durch Selektion auf Km gewonnen werden.

Der Unterschied besteht also darin, daß in ersterem Verfahren das Transpositions-Ereignis vor dem konjugativen Transfer stattfand, während sich bei der Methode von Simon et al. (1983) der Transpositionsvorgang unmittelbar nach

dem Transfer des transposonhaltigen Plasmids pSUP2021 ereignete. In letzterem Fall ist die Effizienz der Transposition höher, da Inhibitoren der Transposition vermutlich erst später in der Zelle gebildet werden (Simon et al. 1983, Lowe und Berg 1983). Dieser Unterschied könnte sich im Mechanismus der Transposition und damit vielleicht in einer Diskriminierung von Insertionsstellen ausgewirkt haben.

Bei beiden tfdA-Mutanten waren die Insertionen des Transposons Tn5 mit großen Deletionen in pJP4 verbunden. Bereits Don und Pemberton (1985) hatten unter den isolierten Transposonmutanten deletierte Plasmide gefunden, deren Deletionen offensichtlich immer von bestimmten Stellen ausgingen. Möglicherweise war die Insertionsstelle im Gen tfdA bzw. im 8 kb EcoRI-Fragment ein bevorzugter Punkt für die Auslösung von Deletionen. Es gibt außerdem Vermutungen, daß die häufig beobachteten Amplifikationen, Deletionen und Umlagerungen von pJP4-Fragmenten durch IS-Elemente auf dem Plasmid vermittelt werden und nach ähnlichen Mechanismen wie Transpositionen verlaufen. Es wäre zu klären, ob die Häufigkeit dieser Vorgänge in einem Zusammenhang mit dem zur Transposonmutagenese verwendeten Verfahren steht.

Die Deletionen in den Plasmiden der tfdA-Mutanten gestatteten es nicht, das mutierte Gen anhand einer Restriktionsanalyse zu identifizieren, wie dies von Don et al. (1985) für die anderen Gene des 2,4-D-Abbaus durchgeführt wurde. Eine Hybridisierung eines markierten Tn5-Fragments mit einem Restriktionsverdau hätte nur die Lage der Transposoninsertion, nicht jedoch deren kausalen Zusammenhang mit der Mutation geklärt.

Erst die gerichtete Mutagenese eines Wildtyp-pJP4 durch homologe Rekombination mit dem transposonmarkierten Fragment (Homogenotisierung) hätte den Nachweis für eine Transposoninsertion in tfdA erbracht. Bei diesem Verfahren wird das Fragment in einen mobilisierbaren Vektor wie pSUP202 kloo-

niert, der sich nur in E. coli replizieren kann. Ähnlich wie bei der Transposonmutagenese kann die von Tn5 kodierte Km-Resistenz nach Transfer des Plasmids in den Wildtypstamm nur durch homologe Rekombination erhalten bleiben (die etwa 100 mal häufiger als das Transpositionereignis stattfindet). Stämme, bei denen ein doppeltes "Crossover", also ein Austausch des Wildtypfragments gegen den mutierten homologen DNA-Abschnitt stattgefunden hat, können dann am Verlust der plasmidkodierten Resistenzmarker erkannt werden.

Das Verfahren der Homogenotisierung war besonders erfolgreich auf die Analyse von nif-Genen in Rhizobien angewandt worden (Ruvkun und Ausubel 1981). Dort wurden Transposon-insertionen in klonierten Fragmenten von Rhizobien-Plasmiden erzeugt und anschließend über doppeltes "Crossover" in Wildtypplasmide integriert. Die Auswirkungen dieser gezielten Mutationen auf den Phänotyp der Rhizobien konnten dann an infizierten Pflanzen getestet werden. Für die Lokalisation von tfdA, deren Ziel letztlich die Klonierung darstellte, war jedoch eine Homogenotisierung zum Nachweis der Mutation, wie sie oben beschrieben wird, nicht unbedingt notwendig.

Stattdessen bot sich der direkte Weg der Komplementation der tfdA-Mutation durch klonierte Wildtypfragmente an. Dabei wurden - wie bereits geschildert - Restriktionsfragmente des Plasmids pJP4 in broad-host-range Vektoren kloniert, dann jedoch nicht in plasmidfreie A. eutrophus-Stämme überführt, sondern in den tfdA-Mutanten auf ihre Komplementationseigenschaft getestet. Auf diese Weise konnte schließlich die tfdA-Genfunktion auf klonierten Fragmenten detektiert werden.

Da die Zahl der pJP4-Fragmente begrenzt war, die für die Klonierung von tfdA in Frage kamen, wurde es vorgezogen, die rekombinanten Plasmide zunächst in E. coli zu klonieren, zu charakterisieren und erst dann durch Konjugation in die

A. eutrophus-Mutanten zu transferieren, wofür sich der E. coli-Stamm S17-1 als besonders geeignet erwies. Bei einer unbegrenzten Anzahl von Fragmenten, wie sie aus einem genomischen Restriktionsverdau oder aus einem Partialverdau entstehen, wäre es freilich auch möglich, Transformanten von E. coli "en masse" mit den Mutanten zu kreuzen, um danach aus den 2,4-D-positiven Klonen die rekombinanten Plasmide zu isolieren und zu charakterisieren. Dieses Verfahren wurde von Ghosal et al. (1985b) bei der Klonierung von Genen des 3-CB-Abbaus angewandt. In diesem Fall muß jedoch bei der Analyse der aus A. eutrophus oder P. putida isolierten Plasmide mit ungewöhnlichen Deletionen oder DNA-Umlagerungen gerechnet werden, welche eine Charakterisierung erschweren (Don, persönl. Mitteilung).

Ein anderes Verfahren zur Klonierung von unbekannten Genen aus Gram-negativen Organismen geht ebenfalls von einer Transposonmutagenese aus, nutzt aber die Vorteile der homologen Rekombination gegenüber der Komplementation. Dieses Verfahren ist deshalb besonders einfach, weil in jedem der einzelnen Schritte direkt auf die gewünschten Rekombinanten selektiert werden kann. Zunächst wird das Tn5-markierte Gen über EcoRI in pSUP202 kloniert und anschließend in den Wildtypstamm transferiert. Mit Hilfe der plasmidkodierten Resistenzmarker werden Mutanten selektiert, bei denen das rekombinante Plasmid über homologe Rekombination (einfaches "cross-over") an der Stelle des Wildtyp-Gens ins Genom integriert wurde. Aus den Mutanten wird die genomische DNA partiell mit EcoRI verdaut und die Restriktionsfragmente werden nach einer Größenselektion mit sich selbst ligiert. Nach Transformation in E. coli erhält man Klone mit rekombinanten Plasmiden, deren Inserts die flankierenden Regionen der Integrationsstelle mitsamt dem Wildtyp-Gen enthalten. Diese Methode wurde erfolgreich bei der Klonierung eines regulatorischen Gens aus A. eutrophus angewandt (B. Friedrich 1986).

Nachdem das Gen tfdA auf einem 3 kb SacI-Fragment von pJP4 kloniert worden war, sollte ein einfaches Verfahren zum Test auf die Expression des Gens entwickelt werden. Ein solches Verfahren wurde schließlich dadurch erhalten, daß in dem pJP4-freien A. eutrophus-Stamm JMP222 mit Hilfe von tfdA die Fähigkeit zum Wachstum auf Phenoxyessigsäure erzeugt werden konnte. Damit konnten Subfragmente und Deletions-derivate auf die Expression von tfdA untersucht werden, was schließlich die Voraussetzung für die spätere Struktur-aufklärung des Gens bildete.

2. Aufklärung der Struktur von tfdA

Die Aufklärung der Genstruktur von tfdA auf der Ebene der Nukleotidsequenz stellte das Endziel der hier beschriebenen Arbeit dar. Da die Struktur eines Gens in der Regel nicht mit absoluter Sicherheit aus der DNA-Sequenz allein abgeleitet werden kann, wurden neben den geschilderten Expressionsstudien in A. eutrophus noch weitere Versuche durchgeführt, um die Transkriptionsrichtung und die Lage und Länge der kodierenden Region des Gens zu bestimmen.

Ein wesentliches Verfahren war in diesem Zusammenhang die Fusion klonierter DNA-Fragmente mit einem T7-Promotor, der die induzierbare Expression des Gens in E. coli ermöglichte. Dadurch konnte - ähnlich wie im Minizell-System - das Translationsprodukt des Gens tfdA spezifisch radioaktiv markiert und gelelektrophoretisch detektiert werden. Darüber hinaus war es mit dieser Methode möglich, die Transkriptionsrichtung des Gens festzustellen.

Das T7-RNA-Polymerase/Promotor System eignete sich ferner zur Untersuchung von Mutationen in tfdA, die durch Insertion von DNA-Fragmenten hervorgerufen wurden. Diese Insertionen führten zur Verkürzung des Translationsprodukts sowie zum Verlust der in den rekombinanten E. coli-Zellen meßbaren

2,4-D-monooxygenase-Aktivität. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieses Systems war dadurch gegeben, daß man das in E. coli überexprimierte Protein in wenigen Schritten effektiv reinigen und über die radioaktive Markierung einfach detektieren konnte, ohne einen Enzymtest entwickeln zu müssen, so daß das gereinigte Genprodukt anschließend zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren verwendet werden konnte.

Die geschilderten Ergebnisse ermöglichten es schließlich, zusammen mit der Nukleotidsequenz Aussagen über die Struktur und die Expression des Gens tfdA zu treffen, Vergleiche mit anderen Genen zu ziehen und mögliche Anwendungen des Gens zu erwägen.

3. Struktur und Expression des Gens tfdA

3.1. Translation

Aus den Untersuchungen zur Expression von tfdA ging hervor, daß die auf dem 1.4 kb XbaI/SalI-Fragment von pJP4 lokalisierte Information in allen verwendeten Organismen (A. eutrophus, Pseudomonas, E. coli) in ein funktionsfähiges Genprodukt, das Enzym 2,4-D-monooxygenase, übersetzt wird. Die Analyse der für die Translation des Gens verantwortlichen Sequenz, die bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit besprochen wurde, ließ keine ungewöhnliche Verwendung der Kodons bei der Translation der kodierenden Region in Aminosäuren erkennen. Auch die gefundene Shine/Dalgarno-Sequenz entsprach den allgemeinen Regeln, wie sie von Genen aus E. coli abgeleitet worden sind. Als Start für die Translation diente ein GTG, das in relativ seltenen Fällen in Prokaryoten als Startkodon verwendet wird. Da sich die bisherigen Erkenntnisse über Genanfänge aber hauptsächlich auf Sequenzen aus E. coli stützen, wäre es denkbar, daß andere, insbesondere GC-reiche Mikroorganismen eine häufigere

Verwendung dieses Startkodons aufweisen. Bei der Translation des N-Terminus wird GTG üblicherweise wie ATG in Formyl-Methionin übersetzt. Der sequenzierte N-Terminus des von tfdA kodierten Proteins stimmte mit der Kodonfolge unmittelbar nach dem GTG überein. Daraus kann gefolgert werden, daß Formylmethionin nachträglich vom Protein abgespalten wurde. Zur Sequenzierung war das Protein durch Überexpression mit Hilfe des T7-Promotors in E. coli gewonnen worden, deshalb kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Protein im Wildtypstamm A. eutrophus JMP134 in der gleichen prozessierten Form vorliegt.

3.2. Transkription und mögliche Promotorstrukturen

Während die kodierende Region des Gens tfdA und die davon abgeleitete Primärstruktur des Genprodukts anhand der vorliegenden Ergebnisse eindeutig bestimmt werden konnten, ist man bei Aussagen über Promotorstrukturen noch auf Vermutungen angewiesen. Die bisherigen Expressionsstudien mit tfdA deuten darauf hin, daß mögliche Promotorstrukturen im 5'-Bereich der XbaI-Stelle (Position 640) zu erwarten sind. Ein weiterer Hinweis ist die überdurchschnittliche Häufigkeit (>50%) der Basen A und T im Bereich zwischen Position 500 und Position 680. Die Analyse der Primärstruktur in diesem Bereich ergab keine signifikante Übereinstimmung mit der von Rosenberg und Court (1979) beschriebenen Prototyp-Sequenz für prokaryotische Promotoren. Dagegen lassen sich mehrere Sequenzen erkennen, die einer Konsensus-Sequenz teilweise entsprechen, welche anhand von 12 Promotoren aus Pseudomonas putida aufgestellt wurde (J. L. Ramos, Genf, persönl. Mitteilung). Um die Relevanz dieser Übereinstimmung abschätzen zu können, wurde anhand der Konsensus-Sequenz eine erweiterte Suchsequenz der folgenden Zusammensetzung aufgestellt:

A/T-G-G-A/C-N₁₀₋₁₄-G/C-G/C-A/T-A/T-A/T-A/T

Sucht man das gesamte sequenzierte 2 kb-Fragment nach Übereinstimmungen zu dieser Sequenz ab, so findet man ein gehäuftes Auftreten (mindestens 4) innerhalb des relativ engen Bereiches zwischen den Positionen 590 und 650, während über die gesamte Länge verteilt auf einen gleichlangen Abschnitt statistisch nur 0.5 solcher Sequenzen entfallen. In Abbildung 38 sind einige sequenzierte Promotoren und die für P. putida aufgestellte Konsensus-Sequenz aufgeführt, ihnen sind mögliche Promotorstrukturen von tfdA gegenübergestellt. Es wäre denkbar, daß es sich bei den abgebildeten Strukturen um sogenannte Tandem-Promotoren handelt, wie sie auch für das Operon der TOL-kodierten meta-Spaltung beschrieben wurden, bei dem die -10 Region des ersten Promotors mit der -26 Region des zweiten Promotors überlappt (Mermod et al. 1984).

Genaue Aussagen über Promotorstrukturen könnten allerdings erst nach einer Kartierung mittels S1-Nuklease oder nach Herstellung von Promotorfusionen gemacht werden. Sollte der Promotor tatsächlich wie vermutet in 5'-Richtung zur XbaI-Stelle liegen, so könnte er leicht mit einem promotorlosen lacZ-Gen oder einem Resistenzgen fusioniert werden. Eine solche Konstruktion könnte auch zur Untersuchung der Regulation von tfdA in A. eutrophus JMP134 dienen.

Bisher ist nicht bekannt, welche Gene für die Regulation des 2,4-D-Abbauweges verantwortlich sind. Erste Hinweise, daß es sich bei tfdA um ein positiv reguliertes Gen handeln könnte, ergaben sich aus der Beobachtung, daß der Abbau von Phenoxoessigsäure in A. eutrophus JMP222 mit einem klonierten tfdA-Gen wesentlich schwächer exprimiert war als in der Mutante JMP134Paa, die über eine funktionsfähige Regulation verfügte. Die schwache Expression des Promotors in A. eutrophus JMP222 und Pseudomonas B13 wurde möglicherweise durch die Verwendung von Plasmiden mit höherer Kopienzahl pro Zelle teilweise kompensiert, so daß die Expression ausreichte, um das Wachstum der Stämme auf dem jeweiligen

Substrat auch ohne Induktion zu ermöglichen.

Ob der Promotor von tfdA auch in E. coli erkannt wird, wurde hier nicht untersucht, da zur Expression in E. coli ausschließlich das T7-Promotor-System verwendet wurde. Amy et al. (1985) hatten schon früher die Expression der 2,4-D Seitenketten-Spaltung durch ein in E. coli kloniertes Fragment nachgewiesen. Auch von anderen katabolischen Genen aus Pseudomonas putida ist bekannt, daß sie in E. coli exprimiert werden. Da auch die zugehörigen Regulationsgene in E. coli ihre Funktion korrekt ausüben können (Mermod et al. 1986), ergäbe sich hieraus die Möglichkeit, mit Hilfe des tfdA-Promotors das Regulationsgen des 2,4-D-Abbauweges aus A. eutrophus in E. coli zu klonieren und seine Funktion zu untersuchen.

4. Eigenschaften der von tfdA kodierten 2,4-D-monooxygenase

Bei dem vom Gen tfdA kodierten Produkt handelt es sich um ein Protein vom Molekulargewicht 32171, das aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Ob das monomere Protein die aktive Enzymform darstellt, oder ob zur Ausbildung der Funktion mehrere der Polypeptidketten nötig sind, kann anhand der vorliegenden Daten noch nicht vorhergesagt werden.

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist die tfdA-kodierte 2,4-D-monooxygenase ein lösliches Enzym. Das geht sowohl aus seinem Verhalten bei der Anreicherung wie aus den Vorhersagen über die Sekundärstruktur und die Hydrophobizität des Proteins hervor. Es lassen sich keine Bereiche erkennen, die für eine Membranassoziation bevorzugt in Frage kämen. Bereits Tiedje und Alexander (1969), sowie Gamar und Gaunt (1971) äußerten anhand von Versuchen an MCPA- und 2,4-D-abbauenden Organismen die Vermutung, daß die Abspaltung der Seitenkette von einem löslichen Enzym katalysiert werde.

Wie schon von Pieper (1986) nachgewiesen wurde, akzeptiert das Enzym ein breites Spektrum an verschiedenen substituierten Phenoxyessigsäuren als Substrate. In dieser Arbeit konnte anhand des klonierten Gens tfdA gezeigt werden, daß die breite Substratspezifität dazu benutzt werden kann, die Abbauleistungen anderer Stämme um bestimmte Verbindungen zu erweitern. So ermöglichte das Gen in A. eutrophus JMP222 Wachstum auf PAA und in Pseudomonas B13 Wachstum auf 4-CPA. Es wäre weiterhin denkbar, daß verschiedene Methyl- und Chlorphenol verwertende Stämme durch das Gen zur Verwertung der korrespondierenden Phenoxyessigsäuren befähigt werden.

Über den Mechanismus der Seitenketten-Spaltung läßt sich heute noch wenig aussagen. Die hier ausgeführten Versuche mit ganzen Zellen von A. eutrophus JMP134 deuten darauf hin, daß die enzymatische Abspaltung der Seitenkette eine von Sauerstoff abhängige Reaktion ist. So setzen mit 2,4-D induzierte Zellen von A. eutrophus JMP134 Phenoxyessigsäure unter Sauerstoffverbrauch um. Durch die Verwendung von PAA anstelle von 2,4-D als Substrat wird dabei ausschließlich der Sauerstoffverbrauch des ersten Schrittes erfaßt, da damit die ebenfalls Sauerstoff verbrauchenden Folgereaktionen des 2,4-Dichlorphenol ausgeschlossen werden können. In Untersuchungen an einem 2,4-D-abbauenden Arthrobacter wurde ebenfalls ein Sauerstoffverbrauch des ersten Reaktionsschrittes festgestellt (Helling et al. 1968), zudem ergaben sich indirekte Hinweise auf Glyoxylsäure als zweites Reaktionsprodukt (Tiedje und Alexander 1969). Während bei Arthrobacter kein Bedarf an Kosubstraten nachgewiesen werden konnte, berichteten Gamar und Gaunt (1971) über eine NADH- bzw. NADPH-abhängige, Sauerstoff verbrauchende Spaltung der Seitenkette bei einem MCPA-abbauenden Pseudomonas.

Im Ganzen ergeben die ersten Enzyme im 2,4-D-Abbau zwar das Bild von Aryl-Alkylether spaltenden Monooxygenasen, wie sie erstmals in Lebermikrosomen nachgewiesen wurden (Axelrod 1956), eine genaue Aussage über den Mechanismus der Reaktion

kann jedoch aufgrund der vorliegenden Daten noch nicht gemacht werden. So ist es bisher nicht gelungen, das Protein in enzymatisch aktiver Form zu isolieren. Während eine andere Monooxygenase, die 2,4-DCP-hydroxylase aus A. eutrophus JMP134, einfach gereinigt und über ihren NADH-Verbrauch leicht nachgewiesen werden kann (Liu und Chapman 1984), blieb ein analoges Vorgehen bei der Reinigung der 2,4-D-monooxygenase bisher ohne Erfolg (eigene Untersuchungen).

5. Vergleich von tfdA mit verwandten katabolischen Genen

5.1. Andere 2,4-D-abbauende Organismen

Über die genetische Struktur des 2,4-D-Abbaus in anderen 2,4-D-abbauenden Organismen ist noch wenig bekannt. Ghosal et al. (1985a) klonierten Gene des 2,4-D-Abbaus vom Plasmid pJP2, das sich in Größe und Anzahl der Restriktionsfragmente deutlich von pJP4 unterscheidet. Klone von P. cepacia mit den EcoRI-Fragmenten EA und EF aus pJP2 exprimierten den Tfd(2,4-D)-Phänotyp. Hybridisierungsexperimente zeigten eine Homologie zwischen dem EcoRI-Fragment EA (15 kb) aus pJP2 und dem EcoRI-Fragment EE (8 kb) aus pJP4. Die Homologie könnte einerseits durch das partiell auf EE von pJP4 gelegene Gen tfdA bedingt sein, könnte andererseits aber auch von einem Abschnitt am anderen Ende von EE herrühren, der seinerseits eine Homologie zu DNA-Abschnitten des 3-CB-Abbaus auf dem Plasmid pAC27 aufweist (Ghosal et al. 1985b) und daher möglicherweise ein noch nicht identifiziertes Regulationsgen trägt. Da für das Gen tfdA jetzt eine spezifische DNA-Probe zur Verfügung steht, könnte eine Hybridisierung mit Fragmenten von pJP2 zur Aufklärung der Genorganisation des 2,4-D-Abbaus auf diesem Plasmid beitragen.

5.2. Abbau von anderen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Als unmittelbar zum 2,4-D-Abbau verwandte metabolische Wege bieten sich die ebenfalls plasmidkodierten Abbauewege von Toluol (TOL) und Naphthalin (NAH) zum Vergleich an. Auf dem NAH- und dem TOL-Plasmid liegen die Gene für den oberen Abbauweg in deutlicher Entfernung zu den Genen des unteren Abbauwegs (Franklin et al. 1981, Harayama et al. 1986). Eine ähnliche Trennung der katabolischen Gene nach ihren Funktionen wurde nun auch für das Gen tfdA gefunden, das zum Gencluster der Hydroxylierung und ortho-Spaltung auf pJP4 einen Abstand von 13 kb aufweist. Auf allen drei Plasmiden repräsentieren die Gene des oberen Weges den oxidativen Abbau der Seitenketten bzw. des anellierten Rings, die Gene des unteren Weges die Spaltung des aromatischen Kerns.

Eine solche Beobachtung stützt die sogenannte "Modul"-Theorie, wonach sich in der Evolution der Abbauewege bereits vorhandene Geneinheiten mit gemeinsamer Regulation (Operons) zu neuen Systemen zusammensetzten. Es gibt Hinweise, daß diese Neukombination von Genen auf illegitimer Rekombination beruht und durch spezifische Sequenzen auf der DNA vermittelt wird. So treten komplexe Veränderungen wie Umlagerungen, Insertionen, Deletionen, Fusionen und Amplifikationen bei den Plasmiden TOL(pWWO), NAH, pAC27 und TFD(pJP4) bevorzugt an bestimmten Stellen auf und gehen meist mit einer Veränderung des Phänotyps einher. Die in dem sequenzierten Abschnitt gefundenen repetitiven Sequenzen könnten Spuren von solchen illegitimen Rekombinationen sein. So ist z.B. bekannt, daß Transposons, die ungenau herausgeschnitten werden, "Fußabdrücke" in Form von repetitiven Sequenzen hinterlassen. Durch diese sequenzspezifischen DNA-Veränderungen in Verbindung mit dem konjugativen Transfer von Plasmiden verfügen die Gram-negativen Bakterien über eine enorme Flexibilität bei der Ausbildung von neuen Abbauleistungen. Die Aufklärung dieser Vorgänge wird in der

Zukunft neue Möglichkeiten zur genetischen in vivo-Manipulation dieser Bakterien schaffen.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal von katabolischen Wegen ist die breite Substratspezifität der beteiligten Enzyme. Sie begünstigt die evolutive Entstehung neuer Abbauewege durch die Kombination bereits vorhandener Genkapazitäten. Die von tfdA kodierte 2,4-D-monooxygenase setzt 2,4-D, MCPA, 4-CPA, PAA und eine Reihe weiterer unterschiedlich substituierter Phenoxyessigsäuren um. Eine vergleichbar breite Spezifität besitzt das erste Enzym aus dem Toluol-Abbau, die von xylA kodierte Xyloxydase, die auch als Toluol-monooxygenase bezeichnet wird. Sie oxidiert Toluol, m- und p-Xylol, Benzylalkohol und Indol (Harayama et al. 1986, Mermod et al. 1986).

Im Gegensatz zur breiten Substratspezifität der katabolischen Enzyme unterliegt deren Regulation häufig einer Einschränkung in Bezug auf die akzeptierten Effektoren. So setzt die 2,4-D-monooxygenase zwar PAA um, wird aber nicht durch PAA induziert. Erst eine Mutation ermöglicht die Erkennung von PAA als Induktor des Enzyms. Auf die gleiche Weise beschränkt das von TOL kodierte regulatorische xylS-Protein die Abbauleistungen von Pseudomonas WR116 auf die Substrate 3-CB und 4-CB (3- und 4-Chlorbenzoesäure). Durch Mutationen am isolierten xylS-Gen und Wiedereinführung des Gens in Wildtypbakterien konnten Stämme mit Abbauleistungen für 3,5-DCB (3,5-Dichlorbenzoesäure) und 4-EB (4-Ethylbenzoesäure) geschaffen werden (Ramos et al. 1986). Die Möglichkeiten, katabolische Gene aufgrund ihrer breiten Substratspezifität neu zu kombinieren sowie regulatorische Gene durch Mutationen an neue Substrate anzupassen, berechtigen zu der Hoffnung, daß neue Abbauewege in vivo und in vitro gezielt erzeugt werden können.

5.3. Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen

Während den für die Oxidation der Seitenketten in 2,4-D und Toluol verantwortlichen Monooxygenasen offensichtlich ein einfacher Aufbau zugrunde liegt, bestehen die bisher bekannten Monooxygenasen für die Oxidation rein aliphatischer Kohlenwasserstoffe aus einem komplexen Enzym-System. So wurde für die Cytochrom P-450cam (Campher-) Hydroxylase aus P. putida wie für die Alkanhydroxylase aus P. oleovorans eine Beteiligung von drei Komponenten nachgewiesen. Die jeweiligen substratspezifischen Hydroxylasen benötigen für die Reaktion zusätzlich ein Elektronen übertragendes Protein (Rubredoxin bzw. Putidaredoxin) und eine von NADH abhängige Redoxin-Reduktase. In beiden Fällen werden die Komponenten von einem Operon kodiert (alcBAC bzw. camDCAB). Da eine vergleichbare Struktur weder für xylA noch für tfdA gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, daß die Oxidationen von 2,4-D und Toluol nach einem grundsätzlich anderen Mechanismus ablaufen. Die Etablierung eines in vitro-Enzymtests mit Hilfe der in E. coli angereicherten 2,4-D-mono-oxygenase könnte zur Aufklärung dieses Mechanismus beitragen.

6. Mögliche Anwendung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse

6.1. Gentechnischer Transfer in Mikroorganismen

Es wurde schon oben erwähnt, daß tfdA bei bestimmten Bakterienstämmen zur Erweiterung von deren Abbauleistungen dienen kann. Bei den bisher getesteten Substanzen aus der Gruppe der Phenoxyessigsäuren handelt es sich allerdings um Verbindungen, für die bereits abbauende Mikroorganismen bekannt sind. Doch könnte das Gen auch in phylogenetisch entferntere Mikroorganismen, wie z.B. *Flavobacterium*, gebracht werden, die bereits über besondere Abbauleistungen

auf dem Gebiet der chlorierten Phenole verfügen, oder die speziell zu diesem Zweck an deren Verwertung adaptiert werden können. Dadurch könnten möglicherweise effektivere Abbauewege auch für schwer abbaubare Verbindungen, wie z.B. 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T), geschaffen werden.

Das System eignet sich außerdem als Modell, um die Möglichkeiten zur in vitro-Konstruktion von bestimmten Abbauewegen zu erforschen. Dabei müssen insbesondere Fragen der Regulation und der genetischen Stabilität berücksichtigt werden. Die hier mit dem Gen tfdA gemachten Erfahrungen haben gezeigt, daß Expression und Stabilität der in broad-host-range Plasmiden klonierten katabolischen Gene nicht ausreichend sind, um den rekombinanten Stämmen das Überleben unter anderen als den im Labor herrschenden Bedingungen zu ermöglichen. Inzwischen sind jedoch schon Vektoren bekannt, die eine höhere Stabilität klonierter Gene in den Wirtsorganismen garantieren. Sie beruhen meist auf Integration der Gene in das Chromosom mit Hilfe von Transposons. Wie unter Punkt 4.2 bereits näher ausgeführt wurde, zeigen die jüngsten Erfolge bei der gentechnischen Manipulation von Regulationsfunktionen, daß auch die Regulation künstlicher Abbauewege kein unlösbares Problem mehr darstellt.

Eine alternative Möglichkeit zur in vitro-Konstruktion von Abbauewegen bedient sich konventioneller genetischer Methoden. Kellogg et al. (1981) inkubierten in einem Chemostaten Mikroorganismen aus 2,4,5-T-belasteter Erde mit reinen Bakterienkulturen, die zahlreiche Plasmide mit Genen für den Abbau von halogenierten Aromaten enthielten. Dieses als "plasmid assisted molecular breeding" bezeichnete Verfahren führte schließlich zur Isolierung eines 2,4,5-T abbauenden Pseudomonas cepacia-Stammes (Kilbane et al. 1982).

Obwohl die Rolle der Plasmide bei diesem Versuch nicht geklärt ist, vermutet man, daß ihr Einsatz die der Natur nachempfundene Evolution neuer Organismen im Labormaßstab begünstigt. Ein einzeln verfügbares Gen wie tfdA könnte nun auf analoge Weise eingesetzt werden. Dadurch könnten einerseits die Vorgänge bei der Entwicklung neuer Abbauewege aus vorhandenem Genmaterial im komplexen System einer Mischkultur untersucht werden, andererseits wäre auch denkbar, daß der massive Einsatz solcher Gene bei entsprechendem Selektionsdruck zu ganz neuen Substratspezifitäten führen kann. Man hofft auch, auf diese Weise Stämme für die Metabolisierung des Umweltgiftes Dioxin zu erhalten.

6.2. Gentechnischer Transfer in höhere Pflanzen

Seit den Anfängen der pflanzlichen Molekularbiologie ist man auf der Suche nach Genen, deren Expression einer höheren Pflanze eine gewünschte Eigenschaft verleiht. Während manche dieser Eigenschaften nur durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Gene zustande kommen, beruhen andere, wie bestimmte Herbizidresistenzen, auf der Funktion einzelner Gene. Deshalb hat man sich zunächst den Herbizidresistenzen zugewandt, da ihre gentechnische Manipulation mit den heutigen Mitteln bereits Aussichten auf Erfolg bietet. Zudem sind Gene, die eine Resistenz gegen Herbizide bewirken, nicht nur für die Landwirtschaft von Bedeutung, sie könnten auch als Marker-Gene zur direkten Selektion von hybriden Pflanzen in der modernen Pflanzenzüchtung eingesetzt werden.

Es war das Hauptziel dieser Arbeit, mit der Klonierung und Charakterisierung von tfdA ein Gen zur Verfügung zu stellen, das sich für die gentechnische Etablierung einer Herbizidresistenz in höheren Pflanzen eignet. Über 2,4-D-resistente Varianten bei Pflanzenzellkulturen wurde bereits verschiedentlich berichtet. Zenk (1974) erzielte eine 2,4-D-Toleranz bei haploiden Zellen von Nicotiana glauca durch Adaption

an höhere Konzentrationen des synthetischen Hormons. Aus den toleranten Zellen konnten jedoch keine Ganzpflanzen mehr regeneriert werden. Nakamura et al. (1986) vermuteten aufgrund von Untersuchungen an einer 2,4-D-resistenten Variante von Nicotiana tabacum eine Modifikation am Wirkmechanismus des 2,4-D in der Zelle, die genaue Ursache für die Resistenz blieb jedoch unbekannt. In wiefern auch Abbauleistungen für die beobachteten Resistenzen verantwortlich sind, kann anhand der bekannten Daten noch nicht entschieden werden.

Dagegen gibt es Untersuchungen über den Metabolismus von 2,4-D bei anderen Pflanzen. Shvetsov und Gamburg (1980) zeigten, daß 2,4-D in Maiszellkulturen schneller abgebaut wird als in Soja. Aufgrund weiterer Untersuchungen vermuten sie einen Abbau durch Abspaltung der Seitenkette ähnlich dem bakteriellen Metabolismus (Shvetsov und Gamburg 1983). Ein gentechnisch auf Pflanzen übertragbares Gen tfdA aus Bakterien könnte einen analogen Schritt in denjenigen Pflanzen etablieren, die gegenüber 2,4-D sensitiv und einer Transformation zugänglich sind. Bei ausreichender Expression müßte dann die Wirkung des Herbizids in der Pflanzenzelle aufgehoben werden, da das Folgeprodukt 2,4-Dichlorphenol selbst keine herbiziden Eigenschaften mehr besitzt und zudem von der Pflanze leichter metabolisiert werden kann.

Daß die Expression bakterieller Gene in Pflanzen grundsätzlich möglich ist, wurde bereits nachgewiesen (Fraley et al. 1983). Kürzlich gelang es Comai et al. (1985), Tabakpflanzen durch die Expression eines mutierten aroA-Gens aus Salmonella typhimurium gegen das Herbizid Glyphosat tolerant zu machen. Nach einer Fusion des Gens mit der Sequenz für das Leader-Peptid der kleinen Untereinheit der Ribulose Biphosphat Carboxylase konnte sogar eine Akkumulation des von aroA kodierten Enzyms in Chloroplasten und damit eine vielfach höhere Resistenz erzielt werden (della Cioppa et al. 1986)

Während die Wirkung in diesen transgenen Pflanzen auf der Substitution eines sensitiven Pflanzenenzym durch ein resistentes Bakterienenzym beruht, könnte die Expression von tfdA in Pflanzen ein Beispiel für die Etablierung einer abbauenden Funktion mit Hilfe eines bakteriellen Gens darstellen. Die Manipulation von Abbaufunktionen in höheren Pflanzen wäre zudem deshalb besonders wertvoll, weil sich damit auch die Probleme von Rückständen in Nahrungspflanzen bewältigen ließen.

Ein Erfolg auf diesem Gebiet würde zu weiteren Anstrengungen bei der Verbesserung von Kulturpflanzen mit den modernen Techniken der Molekularbiologie ermutigen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Bakterienstamm Alcaligenes eutrophus JMP134 ist in der Lage, das Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Die Schritte für den Abbau des Herbizids sind auf dem 80 kb großen, konjugativen Plasmid pJP4 kodiert.

Während fünf Gene des 2,4-D-Abbaus, die Gene tfdB bis tfdF, bereits von einer anderen Arbeitsgruppe lokalisiert und kloniert wurden (Don et al. 1985), war die genaue Lage des Gens tfdA, das den ersten Schritt des Abbauweges kodiert, bisher unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird nun die Klonierung und Charakterisierung des Gens tfdA aus dem 2,4-D-Abbauweg von A. eutrophus JMP134 beschrieben.

1. A. eutrophus JMP134 wurde zunächst mit dem Transposon Tn5 mutagenisiert. Unter den 2,4-D-negativen Mutanten wurden Stämme identifiziert, die im ersten Schritt des Abbauweges, der Reaktion der 2,4-D-monooxygenase, inaktiviert waren.
2. Die tfdA-Mutanten wurden dazu eingesetzt, um Fragmente von pJP4 auf die Komplementation der Mutationen zu testen. Dazu wurden die Fragmente aus dem Wildtypplasmid pJP4 mit Hilfe von broad-host-range Vektoren in E. coli kloniert und anschließend konjugativ auf die tfdA-Mutanten übertragen. Auf diese Weise konnte das für die 2,4-D-monooxygenase kodierende Gen tfdA auf einem klonierten 3 kb SacI-Fragment identifiziert werden.

3. Mit Hilfe der rekombinanten broad-host-range Plasmide wurde tfdA in den pJP4-freien Stamm A. eutrophus JMP222 überführt. Den transkonjuganten Alcaligenes-Stämmen verlieh die Expression des Gens tfdA die Fähigkeit, Phenoxyessigsäure als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Ein mit dem klonierten Gen ausgestatteter Pseudomonas B13 konnte sowohl Phenoxyessigsäure als auch 4-Chlorphenoxyessigsäure verwerten.
4. Die Verwertung von Phenoxyessigsäure durch die transkonjuganten Stämme wurde als Testsystem verwendet, um verschiedene rekombinante Plasmide auf die Expression des Gens tfdA zu untersuchen. Ausgehend von dem tfdA enthaltenden 3 kb Fragment wurde die kodierende Region des Gens durch Deletionen, Insertionen und Subklonieren bis auf ein 1.4 kb großes Subfragment eingegrenzt.
5. Verschiedene klonierte DNA-Fragmente mit dem Gen tfdA wurden mit einem T7-Promotor fusioniert. Mit Hilfe dieser Konstruktionen wurde in Zellen von E. coli, welche die T7-RNA-Polymerase exprimierten, das von tfdA kodierte Genprodukt synthetisiert und spezifisch radioaktiv markiert. Die anschließende gelelektrophoretische Detektion zeigte ein Protein vom Molekulargewicht 32000.
6. Durch einen radioaktiven in vivo-Enzymtest konnte in den tfdA exprimierenden E. coli-Zellen die Aktivität der 2,4-D- monooxygenase nachgewiesen werden.
7. Ein 2 kb langer DNA-Abschnitt, der das Gen tfdA enthielt, wurde sequenziert. Die Analyse der Sequenz ergab einen offenen Leserahmen, der in Lage, Länge und Richtung mit allen über tfdA bekannten Daten übereinstimmte.

8. Die Identität des gefundenen offenen Leserahmens wurde bestätigt durch die Insertion eines DNA-Fragments in eine innerhalb der kodierenden Region gelegene Restriktions-schnittstelle. Sie führte zur Expression eines verkürzten und enzymatisch inaktiven Genprodukts.
9. Die 2,4-D-monooxygenase wurde mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems in E. coli überexprimiert und über Ionenaustauschchromatographie und präparative Gelelektrophorese gereinigt. Vom gereinigten Protein wurde die Sequenz der ersten 16 N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Sie bestätigte den auf der DNA-Sequenz gefundenen Translationsstart des Gens.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Aebersold, R. H., D. B. Teplow, L. E. Hood, and S. B. H. Kent. 1986.
Electroblotting onto activated glass. *J. Biol. Chem.* 261 : 4229-4238.
- Amy, P. S., J. W. Schulke, L. M. Frazier, and R. J. Seidler. 1985.
Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Env. Microbiol.* 49 : 1237-1245.
- Appleyard, R. K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39 : 440.
- Axelrod, J. 1956. The enzymic cleavage of aromatic ethers. *Biochem. J.* 63 : 634-639.
- Bagdasarian, M., and K. N. Timmis. 1982. Host : vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 96 : 47-67.
- Bell, G. R. 1957. Some morphological and biochemical characteristics of a soil bacterium which decomposes 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 3 : 821-840.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513-1523.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41 : 459.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Chou, P. Y., and G. D. Fasman. 1974. Prediction of protein conformation. *Biochem.* 13 : 222-245.
- Clarke, L., and J. Carbon. 1978. Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli : specific complementation of argininosuccinate lyase (argH) mutations. *J. Mol. Biol.* 120 : 517-532.
- della Cioppa, G., C. S. Bauer, B. K. Klein, D. M. Shah, R. T. Fraley, and G. M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 6873-6877.
- Comai, L., D. Facciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. E. Rose, and D. M. Stalker. 1985. Expression in plants of a mutant aroA gene from Salmonella typhimurium confers tolerance to glyphosate. *Nature (London)* 317 : 741.
- Dayhoff, M. O. 1969. Atlas of protein sequence and structure, National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
- Don, R. H., and J. M. Pemberton. 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from Alcaligenes eutrophus and Alcaligenes paradoxus. *J. Bacteriol.* 145 : 681-686.
- Don, R. H., and J. M. Pemberton. 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 161 : 466-468.
- Don, R. H., A. J. Weightman, H.-J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in Alcaligenes eutrophus JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 161 : 85-90.

- Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke, and H.-J. Knackmuss. 1974. Isolation of a 3-chlorobenzoate degrading Pseudomonas. Arch. Microbiol. 99 : 61-70.
- Eigen, M. 1978. The hypercycle: a principle of natural self-organization. Part c: the realistic hypercycle. Naturwissenschaften 65 :341-369.
- Evans, W. C, B. S. W. Smith, H. N. Fernley, and J. I. Davies. 1971. Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. Biochem. J. 122 : 543-551.
- Fisher, P. R., J. Appleton, and J. M. Pemberton. 1978. Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from Alcaligenes paradoxus . J. Bacteriol. 135 : 798-804.
- Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Hoffmann, and S. C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 4803.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from Pseudomonas putida and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 7458-7462.
- Friedrich, B., M. Meyer, and H. G. Schlegel. 1983. Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria. Arch. Microbiol. 134 : 92-97.
- Friedrich, B. 1986. A chromosomal gene controls the expression of plasmid-encoded hox and nir genes in Alcaligenes eutrophus . Genetic Manipulation of Pseudomonads, EMBO Workshop, Geneva.

- Gamar, Y., and J. K. Gaunt. 1971. Bacterial metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate: formation of glyoxylate by side-chain cleavage. *Biochem. J.* 122 : 527-531.
- Garnier, J., D. J. Osguthorpe, and B. Robson. 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120 : 97-120
- Ghosal, D., I.-S. You, D. K. Chatterjee, A. M. Chakrabarty. 1985a. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* 228 : 135-142.
- Ghosal, D., I.-S. You, D. K. Chatterjee, A. M. Chakrabarty. 1985b. Genes specifying degradation of 3-chlorobenzoic acid in plasmids pAC27 and pJP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 1638-1642.
- Guyer, M. S. 1978. The $\gamma\delta$ -sequence of F is an insertion sequence. *J. Mol. Biol.* 126 : 347-365.
- Haniu, M., L. G. Armes, K. T. Yasunobu, B. A. Shastry, I. C. Gunsalus. 1982. Amino acid sequence of the *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 257 : 12664-12671.
- Hansen, J. B. and R. H. Olsen. 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of P-2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.* 135 : 227-238.
- Harayama, S., R. A. Leppik, M. Rekik, N. Mermod, P. R. Lehrbach, W. Reineke, and K. N. Timmis. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the xylA product. *J. Bacteriol.* 167 : 455-461.
- Helling, C. S., J.-M. Bollag, and J. E. Dawson. 1968. Cleavage of ether-oxygen bond in phenoxyacetic acid by an *Arthrobacter* species. *J. Agric. Food Chem.* 16 : 526-527.

- Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with endonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28 : 351-359.
- Hewick, R. M., M. W. Hunkapiller, L. E. Hood and W. J. Dreyer. 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256 : 7990.
- Hopp, T. P., and K. R. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 3824-3828.
- Kellogg, S. T., D. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty. 1981. Plasmid assisted molecular breeding - new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science* 214 : 1133-1135.
- Kieny, M. P., R. Lathe, and J. P. Lecocq. 1983. New versatile cloning and sequencing vectors based on bacteriophage M13. *Gene* 26 : 91-99.
- Kilbane, J. J., D. K. Chatterjee, J. S. Karns, S. T. Kellogg, and A. M. Chakrabarty. 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Env. Microbiol.* 44 : 72-78.
- Knauf, V. C., and E. W. Nester. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8 : 45-54.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Liu, T., and P. J. Chapman. 1984. Purification and properties of a plasmid-encoded 2,4-dichlorophenol hydroxylase. *FEBS Letters* 173 : 314-318.
- Loos, M. A. 1969. Phenoxyalcanoic herbicides. In: P. C. Kearny and D. D. Kaufmann, *Degradation of Herbicides*, p.1. Marcel Dekker Inc., New York.

- Lottspeich, F. 1985. Microscale isocratic separation of phenylthiohydantoin amino acid derivatives. *J. Chromatogr.* 326 : 321-327.
- Lowe, J. B., and D. E. Berg. 1983. A produkt of the transposase gene inhibits transposition. *Genetics* 103 : 609-615.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 : 159-162.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Mermod, N., S. Harayama, and K. N. Timmis. 1986. New route to bacterial production of indigo. *Bio/technology* 4 : 321.
- Mermod, N., P. R. Lehrbach, W. Reineke, and K. N. Timmis. 1984. Transcription of the TOL plasmid toluate catabolic pathway operon of *Pseudomonas putida* is determined by a pair of co-ordinately and positively regulated overlapping promoters. *EMBO J.* 3 : 2461-2466.
- Messing, J., R. Crea, and P. H. Seeburg. 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 9 : 309-321.
- Murray, N. E., W. J. Brammer, and K. Murray. 1977. Lamboid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150 : 53-61.
- Nakamura, C., N. Mori, M. Nakata, and H. Ono. 1986. 2,4-D resistance in a tobacco cell culture variant. II. Effects of 2,4-D on Nucleic acid and protein synthesis and cell respiration. *Plant Cell Physiol.* 27 : 243-251.
- Norrander, J., T. Kempe, and J. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26 : 101-106.

- Pemberton, J. M. 1983. Degradative Plasmids. *Int. Rev. Cytol.* 84 : 155-183.
- Pemberton, J. M., B. Corney, and R. H. Don. 1979. Evolution and spread of pesticide degrading ability among soil microorganisms, p.287-299. In: K. N. Timmis and A. Pühler (ed.), *Plasmids of medical, environmental and commercial importance*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Pieper, D. 1986. Dissertation, Universität Wuppertal.
- Prentki, P., and H. M. Krisch. 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29 : 303-313.
- Queen, C., and L. J. Korn. 1984. A comprehensive sequence analysis program for the IBM personal computer. *Nucl. Acids Res.* 12 : 581-599.
- Ramos, J. L., A. Stolz, W. Reineke, and K. N. Timmis. 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 8467-8471.
- Rogoff, M. H., and J. J. Reid. 1956. Bacterial decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Bacteriol.* 71 : 303-307.
- Ruvkun, G. B., and F. M. Ausubel. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 119-195.
- Rosenberg, M., and D. Court. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13 : 319-353.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463.

- Schwieh, U., and E. Schmidt. 1982. Improved degradation of monochlorophenols by a constructed strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 33-39.
- Sharpe, G. S. 1984. Broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria. *Gene* 29 : 93-102.
- Shepherd, J. W. C. 1981. Method to determine the reading frame of a protein from the purine/pyrimidine genome sequence and its possible evolutionary justification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 1596-1600.
- Shine, J., and L. Dalgarno. 1975. Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 245 :34-38.
- Shvetsov, S. G., and K. Z. Gamburg. 1980. The uptake and metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in cell suspension cultures of maize and soybean. *Fisiol. rast. (Moscow)* 27 : 746-755.
- Shvetsov, S. G., and K. Z. Gamburg. 1983. The degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by maize cells in suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 110 : 395.
- Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983a. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of gram-negative bacteria. In: A. Pühler (ed.), *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. 98-106. Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983b. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/technology* 1 : 784-791.

- Sinton, G. L., L. T. Fan, L. E. Erickson and S. M. Lee. 1986.
Biodegradation of 2,4-D and related xenobiotic compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 8 :395-403.
- Staden, R. 1984. Measurements of the effects that coding for a protein has on a DNA sequence and their use for finding genes. *Nucleic Acids Res.* 12 :551-567.
- Stormo, G. D., T. D. Schneider, and L. M. Gold. 1982. Characterization of translational initiation sites in E. coli . *Nucleic Acids Res.* 10 : 2971-2995.
- Tabor, S., and C. C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 1074-1078.
- Tiedje, J. M., J. M. Duxbury, M. Alexander, and J. E. Dawson. 1969.
2,4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechols by Arthrobacter species. *J. Agric. Food Chem.* 17 : 1021-1026.
- Tyler, J. E., and R. K. Finn. 1974. Growth rate of a pseudomonad on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol. *Appl. Microbiol.* 28 : 181-184.
- Winberg, G., and M. L. Hammarskjold. 1980. Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. *Nucl. Acids Res.* 8 : 253-264.
- Zenk, M. H. 1974. Haploids in physiological and biochemical research.
In: Haploids in higher plants. Advances and potential. Proceedings of the First International Symposium, Guelph, Ontario, Canada. p 339.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk danke ich sehr herzlich für die Anregung zum Thema dieser Dissertation und für die großzügige wissenschaftliche Förderung. Ich danke ihm auch für die in wertvollen Diskussionen gewonnenen Erfahrungen und Einblicke, die mein wissenschaftliches Denken nachhaltig geprägt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Böck für die freundliche Unterstützung in allen Fragen der Mikrobiologie und Genetik. Sein wissenschaftlicher Rat hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn F. Binder, für die Geduld und Hilfsbereitschaft, die sie mir während meines Aufenthalts in ihrem Arbeitskreis entgegenbrachten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. N. Timmis, ohne dessen Unterstützung ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit nicht zustandegekommen wäre. Ich danke ihm und allen seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. R. H. Don, für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft während meines Aufenthalts in Genf.

Frau Prof. Dr. B. Friedrich danke ich für wertvolle Hinweise auf dem Gebiet der bakteriellen Genetik und für die Einweisung in die Technik der Transposonmutagenese.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Hartmann für die freundliche Überlassung der Computerprogramme zur DNA-Sequenzanalyse und seinem Mitarbeiter Herrn P. Heinrich für die Unterstützung in Fragen der Sequenziertechnik.

Herrn Dr. F. Lottspeich und seinem Arbeitskreis danke ich für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit haben meine Eltern und meine Freunde geleistet. Sie brachten mir stets Verständnis und menschliche Anteilnahme entgegen, wofür ich ihnen herzlichst danke.

Diese Dissertation wurde im Rahmen des Genzentrums der Universität München durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker für sein Engagement bei der Leitung dieser Einrichtung und dem BMFT für die finanzielle Unterstützung. Empfänger der Gelder war Prof. Dr. M. H. Zenk.

LEBENS LAUF

Am 24.2.1958 wurde ich, Wolfgang Reinhard Streber, als Sohn des technischen Kaufmanns Kurt Streber und seiner Ehefrau Maria, geb. Frankl, in München geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in den Jahren 1964 bis 1968 trat ich in das Wittelsbacher Gymnasium in München ein, wo ich im Frühjahr 1977 das Abitur des neusprachlichen Zweiges ablegte.

Im November 1977 begann ich das Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich im Oktober 1981 mit dem zweiten Teil des Pharmazeutischen Staatsexamens abschloß. Den praktischen Teil meiner Ausbildung absolvierte ich von November 1981 bis Januar 1982 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Universität München im Arbeitskreis von Prof. Dr. F. Eiden und von Februar 1982 bis Oktober 1982 in einer öffentlichen Apotheke. Mit dem Ablegen des dritten Teils des Pharmazeutischen Staatsexamens erhielt ich im Dezember 1982 die Approbation als Apotheker.

Im gleichen Monat begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. M. H. Zenk am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Im Rahmen der experimentellen Arbeiten war ich von Juni 1984 bis Dezember 1984 am Institut für Mikrobiologie im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Böck tätig und von Juni bis November 1985 verbrachte ich einen Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. K. N. Timmis in der Abteilung für Medizinische Biochemie der Universität Genf.

Bis November 1986 hatte ich eine Stelle am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München inne.

